REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université El-Hadj Lakhdar - BATNA 1

Faculté des Sciences de la Matière

Département de Chimie



MEMOIRE

En vue de l'obtention du

Diplôme de Magister

Présenté par :

Mr BENHABROU HAKIM

Thème :

ETUDE DES COMPOSES CHIMIQUES DE *RESEDA ALPHONSII*

Spécialité : *Chimie organique*

Soutenu le 25 / 05 / 2017

<u>Devant le jury :</u>

Président :	BOUZAHER Yassine	Pr	Université de Batna 1
Rapporteur :	BENKHALED Mohammed	Pr	Université de Batna 1
Examinateurs :	HABA Hamada	Pr	Université de Batna 1
	LEGSEIR Belgacem	Pr	Université d'Annaba

لأمي و أبي

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, Monsieur **Mohammed BENKHALED**, Professeur à l'Université de Batna 1, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses orientations, ses conseils, sa disponibilité, sa gentillesse et surtout sa confiance tout au long de ce travail. Je le remercie également pour tous les efforts qu'il a consentis sans cesse durant la rédaction de ce mémoire, sa disponibilité et son dynamisme pour la recherche des produits naturels et qui ont été pour moi une source de motivation.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Yassine BOUZAHER**, de l'Université de Batna, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens particulièrement à exprimer mes remerciements à Messieurs les Professeurs **Hamada HABA**, de l'Université de Batna 1, et **Belgacem LEGSEIR**, de l'Université d'Annaba, pour avoir aimablement accepté de juger ce modeste travail.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à **Hamada HABA**, **Souad ARRIF** et **Hassina HARKAT** pour leur disponibilité, leur gentillesse ainsi que leurs conseils tout le long de mon travail de mémoire.

Je tiens également à remercier le docteur **Catherine LAVAUD**, Professeur à l'UFR de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, pour la réalisation des spectres RMN, et le docteur **Christophe Long**, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles CNRS-Pierre Fabre, pour la réalisation des spectres de masse.

Un merci collectif à mes collègues de laboratoire, en particulier **Fayçal**, **Ihsan**, **Rachid, aichi**, **Sonia, Maria** et **Rahima**.

Je remercie mes amis, **Liamine, Fouzi**, **Samir**, **Brahim**, **Nabil**, **Younes** et **Rachid**, pour leurs encouragements quant à la réalisation de ce mémoire.

Je ne saurais oublier toute ma famille, particulièrement mes parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans cette longue et pénible épreuve que représente ce mémoire ainsi que mon épouse , mes fils **Med Abdeljalil** et **Adam**, mes frères et sœurs.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

°C	Degré Celsius
δ	Déplacement chimique
λ	Longueur d'onde
(1), (2), (3)….	Symboles utilisés pour les composés mentionnés dans la littérature
1D	Monodimensionnel
2D	Bidimensionnel
A, B, C…	Symboles utilisés pour les composés identifiés dans cette étude
AcOEt	Acétate d'éthyle
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$	Chloroforme deutéré
$CHCl_3$	Chloroforme
Cinn	Cinnamoyle
cm	centimètre
COSY	Spectroscopie de corrélation
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
ESI	ElectroSpray Ionization
FAB	Fast Atomic Bombardment
g	gramme
H_2O	Eau
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
Hz	Hertz

IR	Infra-Rouge
J	Constante de couplage (RMN)
m	Multiplet
m/z	Masse / charge électrique
Me	Méthyle
CD_3OD	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
ml	Millilitre
MS	Mass Spectrometry
Nd	non déterminé
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p	Para
ppm	Partie par million
rdt	Rendement
Rf	Retention Factor (CCM)
Rha	Rhamnose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RP-18	Reversed Phase Silica with C-18 functional groups
s	Singulet
sept	Septuplet
sl	Singulet large

t	Triplet
TMS	Tétraméthylsilane
UV	Ultra-violet

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 3 : SEPARATION DES COMPOSES ET ELUCIDATION STRUCTURALE

CHAPITRE 4 : PARTIE EXPERIMENTALE

Introduction

INTRODUCTION

Depuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son mieux être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tout type de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui "la médecine traditionnelle". L'étude de ces connaissances ancestrales par les sciences modernes révèle progressivement quelques secrets de la nature qui permettent à l'homme de poursuivre son évolution. C'est dans ce cadre que des disciplines hétérogènes telles que la botanique, la photochimie, la biologie, l'anthropologie et bien d'autres sont mises en œuvre afin de décrire et d'interpréter les pharmacopées traditionnelles.

Dans ce domaine, la phytochimie ou chimie des végétaux, tient une bonne place car elle se charge d'étudier ces substances actives, leurs structures, leur distribution dans la plante, leur modification et les processus de transformation qui se produisent au cours de la vie de la plante. Elle est en liaison étroite avec d'autres disciplines telles que la pharmacognosie (du grec: pharmacon, drogue et gnôsis, connaissance) traitant des matières premières et des substances à potentialité médicamenteuse d'origine végétale.

Le présent travail rentre en droite ligne du programme de recherche de notre laboratoire destiné principalement à la valorisation de la flore locale par la découverte éventuelle de principes actifs nouveaux, et s'inscrit donc dans la recherche de nouvelles biomolécules qui peuvent être utilisées en thérapeutique. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique d'une plante nommée *Reseda alphonsii*, plante saharienne rare appartenant à la famille Resedaceae. Cette dernière s'avère très pourvue en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique. En effet, elle est bien connue pour sa richesse en flavonoïdes. Ces composés, au sens large, représentent un groupe de composés polyphénoliques couvrant un vaste domaine d'activités biologiques. Ils sont connus surtout pour leurs propriétés antioxydantes, veinotoniques et leurs aptitudes à modifier l'activité des systèmes enzymatiques et interagir avec les récepteurs cellulaires [1]. Ils sont également connus pour leurs activités antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, hépatoprotectrice, antiproliférative, estrogénique et/ou anti-estrogénique. Les isoflavonoïdes, sont connus pour leur capacité à se fixer sur les récepteurs aux estrogènes conduisant à une activité estrogénique et/ou anti-estrogénique [1]. Ce sont également des inhibiteurs des tyrosine-kinases, enzymes qui joueraient un rôle dans les processus de régulation, de la transformation et de la prolifération cellulaires [1].

Notre intérêt porté à l'étude de *Reseda alphonsii* s'explique également par le fait que l'espèce en question n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique, au regard de la recherche bibliographique exhaustive réalisée.

Les résultats de ce travail seront présentés comme suit :

- Une première partie appelée travaux antérieurs, consacrée à la description botanique de la plante, aux propriétés biologiques du genre *Reseda* ainsi qu'aux études chimiques antérieures réalisées sur le genre et l'espèce.
- Une seconde partie consacrée à une étude impliquant la structure, classification, activité biologique et biosynthèse des composés terpéniques.
- Une troisième partie décrivant nos travaux personnels allant de la séparation à la détermination de structure des produits isolés.
- Une quatrième partie constituant la partie expérimentale.
- Enfin, une conclusion générale résumant les résultats obtenus. .

Chapitre 1
Travaux antérieurs

1.1 Description botanique

1.1.1 Introduction

La famille Resedaceae, appelée également Mignonette [2], renferme six genres et environ 85 espèces. Elle est largement distribuée dans le bassin méditerranéen, qui constitue un centre majeur quant à la diversité des espèces qui forment cette famille [3]. Elle est représentée au Sahara, par cinq genres que sont *Reseda*, *Randonia*, *Ochradenus*, *Caylusea* et *Oligomeris* [4]. *Astrocarpus* étant le sixième genre de la famille [5]. Les plantes appartenant à cette famille, présentent une morphologie florale assez spéciale. Les pétales, au moins les supérieurs, sont souvent divisés en lanières, les étamines sont nombreuses et insérées au-dessus d'un renflement annulaire de l'axe floral appelé *disque*. Ces caractères sont d'ailleurs très variables d'un genre à l'autre, ainsi que la structure du pistil et du fruit [4].

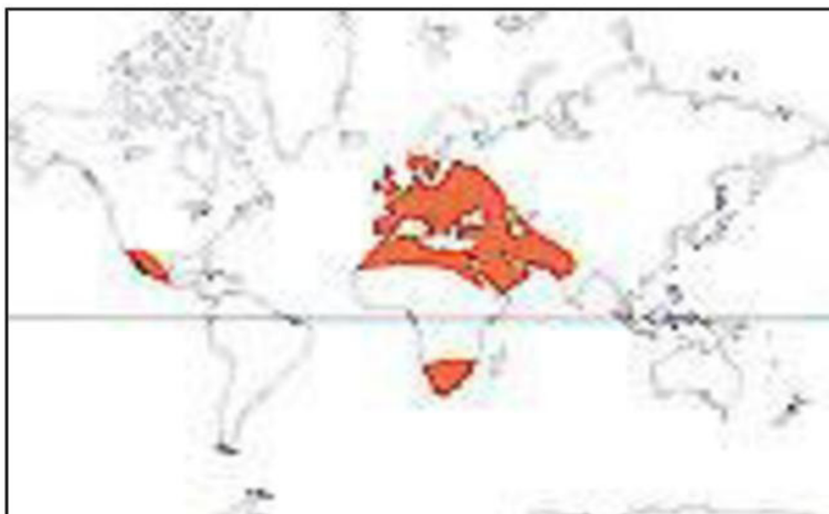


Figure 1.1 : Distribution des plantes Resedaceae à travers le monde

1.1.2 Classification

Les plantes Resedaceae sont incluses dans l'ordre des Brassicales [3]. Leur taxonomie a été traditionnellement fondée sur des données morphologiques (on citera la structure de l'ovaire, la forme des pétales et l'ornementation des semences). Les plus compréhensives taxonomies des Resedaceae ont été publiées par Müller Argoviensis (1857, 1864), et par Abdallah et de Wit (1978) [3]. Elles sont pour la plupart en accord à l'égard des subdivisions intrafamiliales, bien qu'elles diffèrent quant au nombre d'espèces [3].

La famille a été divisée en trois tribus (Astrocarpeae, Cayluseae et Resedeae), circonscrits par le type d'ovaire et la placentation (Figure 1.2). La tribu Resedeae a également été divisée en deux sous-tribus sur la base de la position relative des sépales, pétales et des étamines [3]. La sous-tribu Randoninae caractérisée par ses fleurs perigynes et la sous-tribu Resedinae incluant le genre *Reseda*, par des fleurs hypogynes [3].

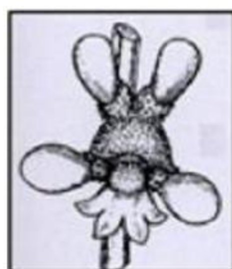
Tribu Cayluseae (*Caylusea*)
Ovaire semi-infère
Placentation basale et centrale





Tribu Astrocarpeae (*Sesamoides*)
Ovaire infère
Placentation marginale





Tribu Resedaceae
(*Ochradenus*, *Oligomeris*, *Randonia*, *Reseda*)
Ovaire syncarpe, placentation pariétale





Figure 1.2 : Caractères diagnostiques de la classification tribale de la famille Resedaceae en fonction du type d'ovaire et de la placentation [3]**.**

Les plus recentes nouveautés taxonomiques sont des réarrangements des genres *Ochradenus* (Miller, 1984) et *sesamoides* (López González, 1986, 1990), en plus de la description de quelques nouvelles espèces des genres *Reseda* et *Ochradenus*, principalement du Nord-est de l'Afrique et de la péninsule arabique [3].

La classification de la famille Resedaceae s'établit comme suit :

Règne	Plantae	Plantes
Sous-règne	Tracheobionta	Plantes vasculaires
Superdivision	Spermatophyta	Plantes à graines
Division	Magnoliophyta	Plantes à fleurs
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledons
Sous-classe	Dilleniidae	Dilleniidae
Ordre	Capparales	Capparales
Famille	Resedaceae	Famille Mignonette

Tableau 1.1 : Position systématique de la famille Resedaceae

1.1.3 Aspects botaniques et répartition géographique du genre *Reseda*

Le genre *Reseda* est de loin le plus grand genre dans la famille avec environ 65 espèces [3]. Les plantes de ce genre sont des herbes annuelles ou pérennes, rarement des arbrisseaux. Elles présentent des feuilles larges, simples ou divisées et dont les plus grandes dépassent 1 cm de largeur. Le fruit est formé d'une capsule prismatique terminée en courtes cornes et ouverte par des pores à son extrémité [4]. Les fleurs sont à 4-6 sépales, 4-7 pétales hypogynes et dissemblables (les supérieurs sont plus grands et multifides) et à 8-25 étamines insérées sur un disque [5].

En Algérie, on distingue 22 espèces et sous-espèces [4]. Les espèces *Reseda villosa* et *R. arabica* sont très fréquentes au Sahara. Les autres espèces sont beaucoup plus rares [4, 5,6].

1.1.4 Caractéristiques botaniques de l'espèce *alphonsii*

D'après Ozenda [4], *Reseda alphonsii* est une espèce endémique saharienne présente au Tassili des Ajjer, rare au Sahara septentrional. Elle est présente dans la région de Biskra. C'est une plante glabre ou peu velue à feuilles non crispées sur les bords, disposant de tiges puissantes, atteignant souvent un mètre et de feuilles entières lancéolées dont les supérieures sont souvent tripartites. Les fleurs ont 15 à 18 étamines, à pétales jaunâtres.









Figure 1.3 : Photographie *de Reseda alphonsii*

Figure 1.4 : *Reseda alphonsii* d'après Ozenda (1991) [4].

1.2 Propriétés biologiques et pharmaceutiques du genre *Reseda*

1.2.1 Introduction

L'humanité a toujours tiré profit des médicaments de la nature. Les extraits de plantes, pour le traitement d'affections diverses, ont été très bien exploités par les civilisations antiques. Même aujourd'hui, les matières végétales restent une importante ressource pour la lutte contre diverses maladies, infectieuses, cancéreuses et autres. Un nombre important de ces plantes, à travers leur métabolisme secondaire, ont servi de modèle pour le développement d'agents thérapeutiques [7].

1.2.2 Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes du genre *Reseda* sont remarquablement utilisées en médecine traditionnelle. Ainsi, les extraits de *Reseda muricata* sont utilisés dans les traitements externes des hémorroïdes, contre les maux d'estomac et les diarrhées [8]. L'espèce *Reseda odorata* Linn., connue sous le nom de mignonette et cultivée pour son doux parfum, a été employée médicalement par les romains pour apaiser les inflammations [9, 10]. Elle est utilisée contre l'irritation et pour le soulagement des douleurs. Les graines sont appliquées de façon externe comme remède résolutif (fait disparaitre une inflammation sans écoulement de pus [11]). La racine, âcre, est utilisée en Espagne comme laxatif, diurétique et sudorifique [12].

Reseda amarilla (*Resda jaune*), également résolutive, est appliquée extérieurement sur les tumeurs inflammatoires [10].

Dans la région de Fès, l'infusion des feuilles de *Reseda luteola* ainsi que celles de *Reseda alba* est utilisée contre les diarrhées, les coliques et les intoxications digestives provoquées par l'ingestion de gris-gris (*tawkal*) [13].

Dans la médecine traditionnelle tunisienne, les plantes *Reseda alba* et *Reseda suffruticulosa L.* sont indiquées principalement contre les leucomes oculaires [13]. Les feuilles sont utilisées en décoction sous forme d'instillation, ou bien mâchées et déposées sur l'œil. Certains préconisent l'emploi de l'écorce des racines mâchées et exprimées à travers un tissu en gouttes oculaires pour soigner l'irritation des yeux. Il est également rapporté des propriétés cicatrisantes et antirhumatismales de *Reseda alba* [14].

L'espèce *Reseda lutea* est utilisée comme cicatrisante, diurétique, sédative et sudorifique [15, 16]. Ses racines sont signalées comme diurétiques et purgatives [17].

1.2.3 Autres usages

Reseda lutea a une grande valeur économique dans l'industrie turque des moquettes et tapis où elle est utilisée avec *Reseda luteola*, comme sources de teinture naturelle [18]. La couleur jaune dans les teintures est obtenue principalement de *Reseda lutea* et *Reseda luteola* [17].

En Australie, Iran, Turquie [18] et Syrie [19] les éleveurs utilisent *Reseda lutea* comme source de nourriture sèche en hiver et fraîche au printemps et été, pour leur bétail [17].

L'espèce *Reseda lutea* est aussi utilisée pour combattre l'érosion en raison de la croissance rapide de ses racines qui peuvent atteindre une profondeur de 80 à 100 cm [17, 18]. Elle constitue une bonne plante pour les abeilles et les papillons [19], et donc une précieuse source de production du miel, grâce à sa haute sécrétion de nectar [18].

Reseda alba et *Reseda odorata*, sont beaucoup appréciées comme plantes de jardin [20]. La dernière possède un parfum superbe [20]. De ses fleurs, une huile éthérée est distillée [20].

1.2.4 Activités biologiques

Les extraits chloroformiques de *Reseda ducrsiva*, *Reseda muricata* et *Reseda pruinosa* ont montré une activité cytotoxique à une concentration de 50 µg/ml, contre le carcinome du côlon (HCT 116) [21].

Les extraits chloroformiques de *Reseda ducrsiva*, *Reseda muricata* et *Reseda pruinosa* ont montré une activité cytotoxique contre le cancer du sein (MCF7). Les acides phénoliques et les alcaloïdes seraient les responsables de cette activité [21].

Une étude, a montré pour la première fois, que l'extrait solubilisé riche en lutéoline de *Reseda luteola*, appliqué localement, agit efficacement contre l'inflammation de la peau induite par les rayons ultraviolets UV-B, grâce à son excellente tolérance cutanée [22]. Cet extrait s'avère potentiellement prometteur pour le traitement et la prévention des inflammations de la peau comme les coups de soleil. En outre, cet extrait protégerait l'ADN, le collagène et d'autres composants de la peau du rayonnement solaire [22].

Comme les processus d'oxydation sont un important facteur impliqué dans le photo-vieillissement et le développement du cancer de la peau, les propriétés anti-oxydantes de la lutéoline pourraient servir à l'élaboration de stratégies anti-cancer. En outre, la lutéoline montre de nombreux effets anti-inflammatoires à des concentrations micro-molaires [22].

Au cours des dernières années, plusieurs mécanismes anti-inflammatoires de la lutéoline ont été identifiés. Elle inhibe, à titre d'exemple, la libération de la prostaglandine D2 (PGD-2) et des leucotriènes par les mastocytes humains [22].

Une étude sur les différentes parties (racines, fleurs et fruits) de *R. lutea*, reporte l'identification de deux isothiocyanates, et une activité cytotoxique du mélange. Ces résultats renforcent la littérature qui mentionne des activités thérapeutiques contre les tumeurs attribuées à cette plante [23].

1.3 Etudes chimiques antérieures

1.3.1 Sur le genre

La recherche bibliographique effectuée sur le genre *Reseda* a révélé que ce genre a été très peu investi chimiquement. La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de métabolites secondaires constitués essentiellement de flavonoïdes, glucosinolates et dérivés acides.

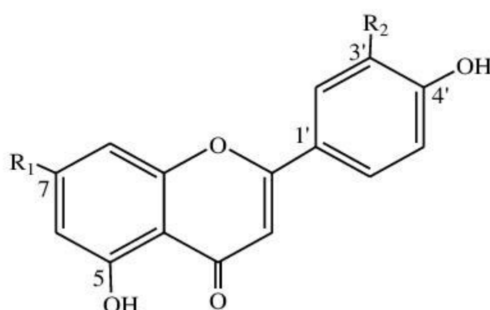
1.3.1.1 Flavonoïdes

Sept flavones, 16 flavonols et un isoflavone ont été rapportés suite à l'investigation chimique du genre *Reseda* [6].

1.3.1.1.1 Flavones

Il apparait que les flavones que sont l'apigénine (**1**) et son dérivé 7-*O*-glucoside (**2**), la lutéoline (**3**) et ses dérivés 7-*O*-glucoside (**4**) et 3'-*O*-glucoside (**5**), sont caractéristiques des espèces *Reseda muricata* [7], *R. pruinosa* [24] et *R. luteola* [25, 26].

Le dérivé diglucosilé, lutéoline-3',7-*O*-*β*-D-diglucoside (**6**) a été rencontré au sein de l'espèce *R. luteola* [26, 27]. La lutéoline-7-rutinoside (**7**) a été isolée de *R. gredensis* [28].



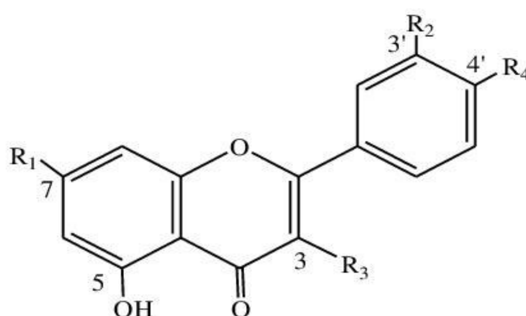
composé	Nomenclature	Structure	Plantes
(**1**)	Apigénine	R_1 = OH et R_2 =H	*R.muricata* [7] *R. pruinosa* [24] *R. luteola* [25, 26]

(**2**)	Apigénine 7-*O*-glucose	R_1 = *O*-glucose et R_2 = H	*R. muricata* [7] *R. pruinosa* [24] *R. luteola* [25, 26]
(**3**)	Lutéoline	R_1 = OH et R_2 = OH	*R. muricata* [7] *R. pruinosa* [24] *R. luteola* [25, 26]
(**4**)	Lutéoline-7-*O*-glucoside	R_1 = *O*-glucose et R_2 = OH	*R. muricata* [11] *R. pruinosa* [24] *R.luteola* [25, 26]
(**5**)	Lutéoline -3'-*O*-glucoside	R-1 = OH et R_2 = *O*-glucose	*R. muricata* [7] *R. pruinosa* [24] *R. luteola* [25, 26]
(**6**)	Lutéoline -3', 7- *O*-*β*-D- di-glucoside	R_1 = *O*-glucose et R_2 = *O*-glucose	*R. luteola* [26, 27]
(**7**)	Lutéoline-7-rutinoside	R_1 = rutinosyl et R_2 = OH	*R. gredensis* [28]

1.3.1.1.2 Flavonols

Les flavonols aglycones, kaempférol (**8**) et quercétine (**9**), ont été isolés des espèces *Reseda muricata* [7], *R. odorata* [29], et *R. phytuma* [30]. L'isorhamnétine (**10**) a été isolée des espèces méditerranéenes *Reseda odorata* et *R. lutea* [31].

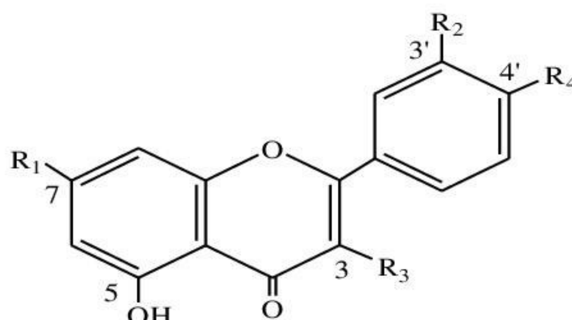
Les flavonols monoglycosilés, 7-*O*-rhamnoside, 7-*O*-glucoside et 3-*O*-glucoside ont été trouvés dans trois espèces du genre *Reseda*. Kaempférol-7-*O*- *α*- L-rhamnoside (**11**) a été isolé de *Reseda pruinosa* [24] et *R. villosa* [6], alors que kaempférol-7-*O*-*β*-D-glucoside (**12**), kaempférol-3-*O*-*α*-L-rhamnoside (**13**) et quercétine-7-*O*-*β*-D-glucoside (**14**) ont été isolés de l'espèce *Reseda muricata* [7].



Composé	Nomenclature	Structure	Plantes
(**8**)	Kaempférol	R_1 = OH R_2 = H R_3 = OH R_4 = OH	*Reseda muricata* [7] *R. odorata* [29] *R. phytuma* [30]

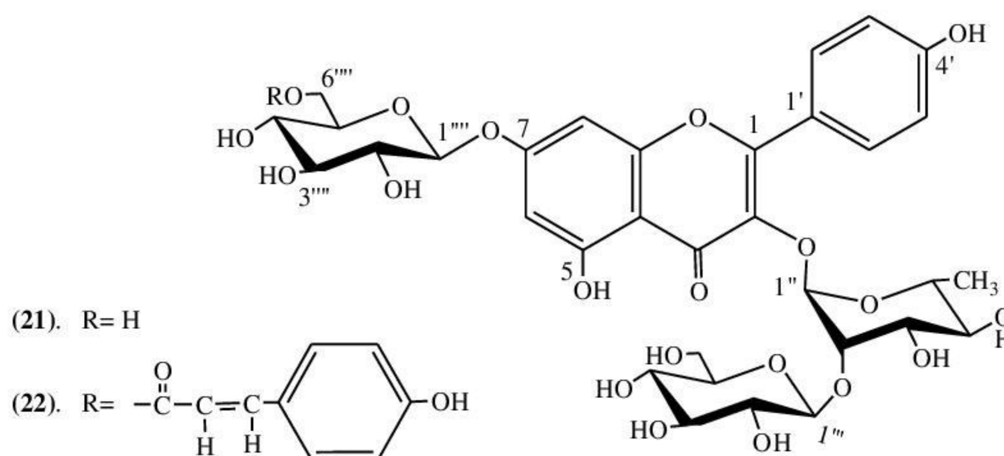
(**9**)	Quercétine	R_1 = OH R_2 = OH R_3 = OH R_4 = OH	*R. muricata* [7] *R. odorata* [29] *R. phytuma* [30]
(**10**)	Isorhamnétine	R_1 = OH R_2 = OCH_3 R_3 = OH R_4 = OH	*R. odorata* [31] *R. lutea* [31]
(**11**)	Kaempférol-7-*O*- α- *L*-rhamnoside	R_1 = *O*- rhamnosyl R_2 = H R_3 = OH R_4 = OH	*R. pruinosa* [24] *R. villosa* [6]
(**12**)	kaempférol-7-*O*-*β*-*D*-glucoside	R_1 = *O*- glucosyl R_2 = H R_3 = OH R_4 = OH	*R. muricata* [7]
(**13**)	Kaempférol-3-*O*-α-*L*-rhamnoside	R_1 = OH R_2 = H R_3 = *O*- rhamnosyl R_4 = OH	*R. muricata* [7]
(**14**)	Quercétine-7-*O*-*β*-*D*-glucoside	R_1 = *O*- glucosyl R_2 = OH R_3 = OH R_4 = OH	*R. muricata* [7]

Les flavonols diglucosilés des kaempférol, quercétine et isorhamnétine, ont été signalés dans quatre espèces. Le kaempférol-7-*O*-α-*L*-rhamnosyl-3-*O*-*β*- *D* -glucoside (**15**) a été trouvé dans *Reseda luteola* [32] et *R. villosa* [6] alors que la quercétine-7-*O*-α-*L*-rhamnosyl-3-*O*-*β*-*D*-glucoside (**16**) a été rencontrée au niveau des espèces *R. lutea* [33] et *R. villosa* [6]. L'isorhamnétine-3-*O*-*β*-*D*-glucosyl-7-*O*-α-*L*-rhamnoside (**17**) [6, 34] a été signalée dans *R. lutea* et *R. odorata*, qui contiennent également l'isorhamnétine-3-*O*-*β*-*D*-glucosyl-4''-α-*L*-rhamnoside (**18**). Ce dernier composé a été également signalé lors de l'investigation chimique de *Reseda gredensis* [28]. Le kaempférol-3,7-*O*-α-*L*- dirhamnoside (**19**) a été isolé pour la première fois dans le genre *Reseda*, à partir des parties aériennes de l'espèce *Reseda villosa* [6]. L'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (**20**) a été rencontré dans l'espèce *Reseda pruinosa* Del. [24].



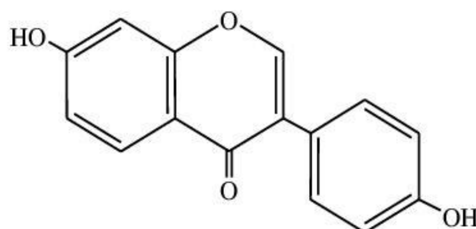
composé	Nomenclature	Structure	Plantes
(**15**)	Kaempférol-7-*O*-α-*L*-rhamnosyl-3-*O*-*β*-*D*-glucoside	R_1 = *O*- rhamnosyl R_2 = H R_3 = *O*- glucosyl R_4 = OH	*Reseda luteola* [32] *R. villosa* [6]
(**16**)	Quercétine-7-*O*-α-*L*-rhamnosyl-3-*O*-*β*-*D*-glucoside	R_1 = *O*- rhamnosyl R_2 = OH R_3 = *O*- glucosyl R_4 = OH	*R. lutea* [33] *R. villosa* [6]
(**17**)	Isorhamnétine -3-*O*-*β*-*D*-glucosyl-7-*O*-α-*L*-rhamnoside	R_1 = *O*- rhamnosyl R_2 = OCH_3 R_3 = *O*- glucosyl R_4 = OH	*R. lutea* [34] *R. odorata* [34] *R. villosa* [6]
(**18**)	Isorhamnétine-3-*O*-*β*-*D*-glucosyl-4'-α-*L*-rhamnoside	R_1 = OH R_2 = OCH_3 R_3 = *O*- glucosyl R_4 = *O*- rhamnosyl	*R. lutea* [34] *R. odorata* [34] *R. gredensis* [28]
(**19**)	Kaempférol-3,7-*O*-α-*L*-dirhamnoside	R_1 = *O*- rhamnosyl R_2 = H R_3 = *O*- rhamnosyl R_4 = OH	*R. villosa* [6]
(**20**)	Isorhamnétine-3-*O*-rutinoside	R_1 = OH R_2 = OCH_3 R_3 = *O*- rutinosyl R_4 = OH	*R. pruinosa* [24]

Nabil H. El-Sayed et collaborateurs [7], ont isolé deux flavonols triosides à partir des parties aériennes de *Reseda muricata* : Kaempférol 3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-(1'''→2'')-*O*-α-*L*-rhamnopyranoside 7-*O*-*β* -*D*-glucopyranoside (**21**) et son coumaryl ester, Kaempférol 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1'''→2'')-O-α-L-rhamnopyranoside 7-*O*-β -D-(6''''-*O*-E-glucopyranoside) (**22**).



1.3.1.1.3 Isoflavone

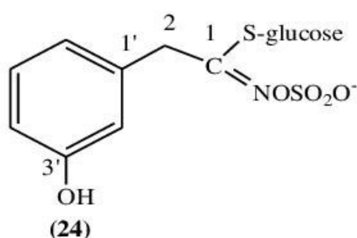
Le seul isoflavone mentionné, en l'occurrence la daidzéine (**23**), a été isolé de l'espèce *Reseda luteola* [32].



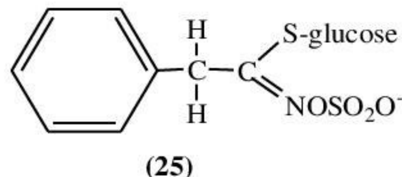
(23) Daidzéine

1.3.1.2 Glucosinolates

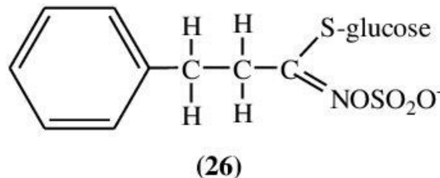
Ole Olsen et Hilmer Sorensen [35], ont étudié l'espèce *Reseda Media* .Cette étude effectuée sur les parties aériennes, a permis d'isoler trois glucosinolates en quantités appréciables : *m*-hydroxybenzylglucosinolate (**24**), benzylglucosinolate (**25**) et 2-phenylethylglucusinolates (**26**). Ce dernier est aussi présent dans l'espèce *reseda luteola* [36] avec le (3- indolyl)methylglucosinolate (**27**) en traces**.**



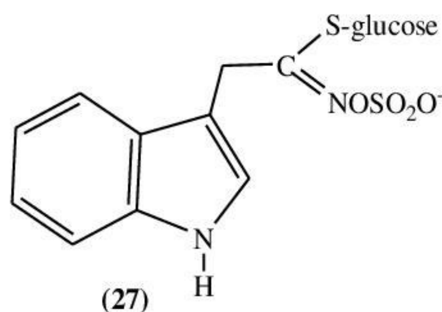
(24)



(25)



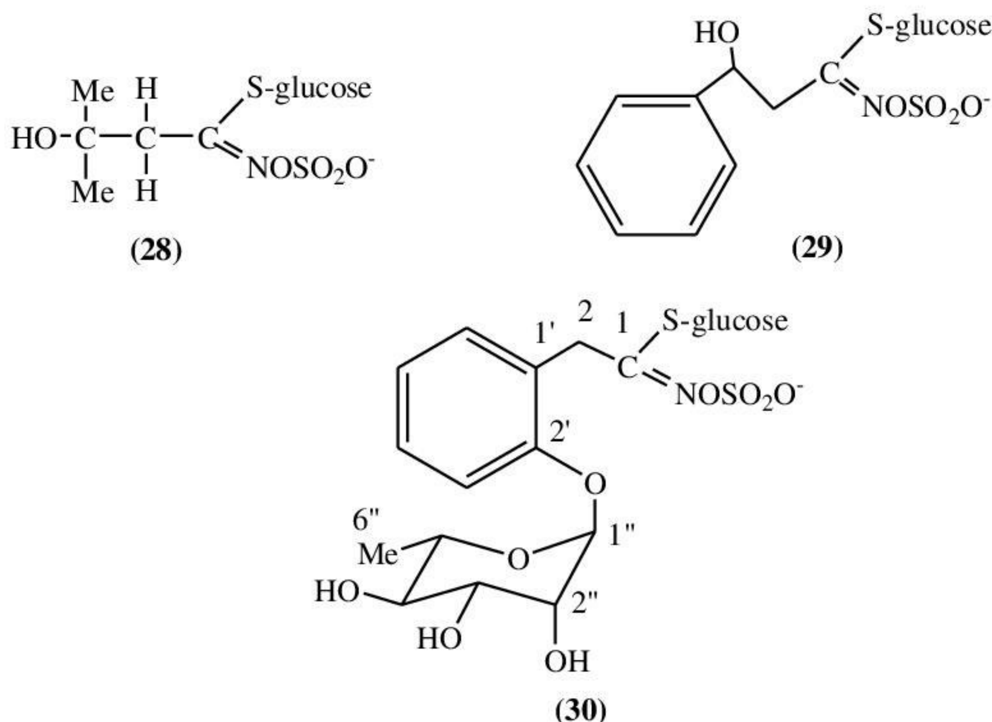
(26)



(27)

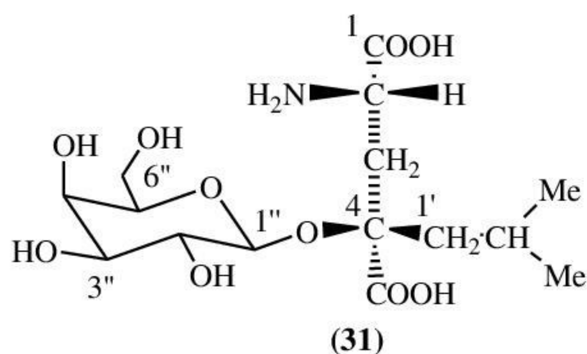
Les mêmes chercheurs (Ole Olsen et Hilmer Sorensen), dans une investigation précédente (1979) [37], ont isolé trois composés de type glucosinolate, 2-hydroxy-2-methylpropyl glucosinolate (**28**) à partir de *Reseda alba*(isolé encore par Rolf Gmelin et Anders kjaer [38] à partir de l'extrait méthanolique des graines *de Reseda alba*)**,** 2-hydroxy-2-

phenylethylglucosinolate (**29**) à partir de l'espèce *Reseda luteola* et *O*-(α-L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolates (**30**) à partir *de Reseda odorata.*



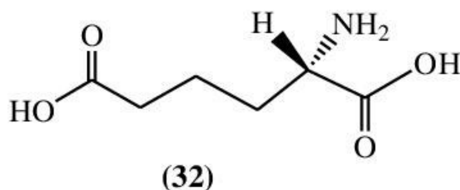
1.3.1.3 Acides

Peder Olsen Larsen et collaborateurs [39] ont isolé un nouvel acide aminé : **2(S),4(R)-4-(β-D-Galactopyranosyloxy)-4-isobutyl-glutamique** (**31**) à partir des fleurs de l'espèce *Reseda odorata.*

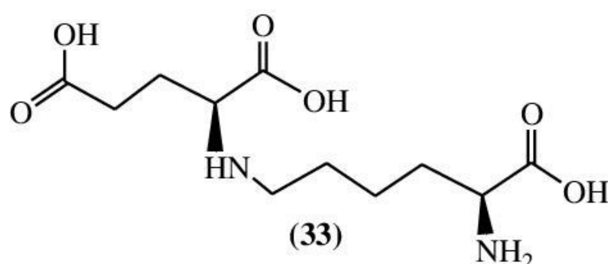


Une investigation chimique effectuée sur les divers extraits de l'espèce *Reseda odorata*, a permis d'isoler les composés suivants : Acide 2(S)-2-aminoadipique (**32**), 2(S),2'(S)-N^6- (2'-Glutaryl) lysine (L-saccharopine) (**33**) et l'acide 5(S), 5'(S)-N-(5'-amino-5'-carboxypentyl) 2-pyrrolidone-5-carboxylique (L-pyrosaccharopine) (**34**) [40]. Les auteurs ont

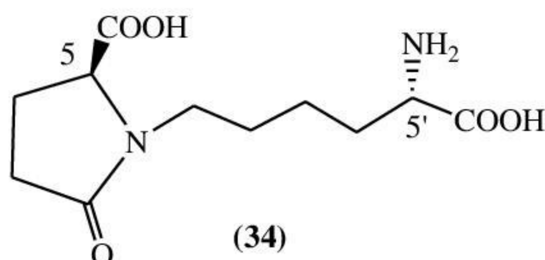
utilisé les méthodes traditionnelles en incluant la chromatographie par échange d'ions et par électrophorèse à haute tension (HVE) [40].



(32)

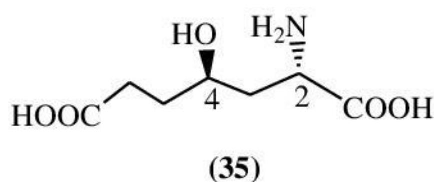


(33)

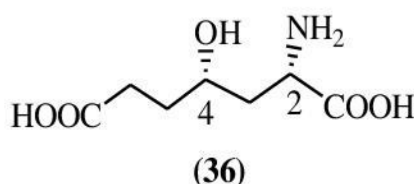


(34)

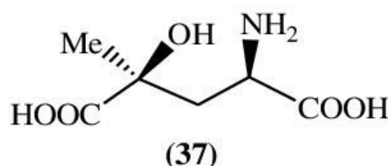
Une investigation menée sur l'extrait méthanolique des fleurs de l'espèce *Reseda luteola*, a permis d'isoler et séparer deux paires de diastereoisomères de type acido aminoacide (**35**), (**36**), (**37**), (**38**) [41]. Les auteurs ont mentionné encore la présence des composés (**39**), (**40**), (**41**) et (**42**) dans toutes les parties de *Reseda luteola* [41], ainsi que de quantités importantes de l'acide γ-glutamylglutamique (**43**) et de glutathione (**44**) dans ses parties vertes [41].



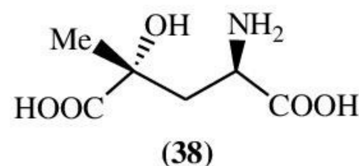
(35)



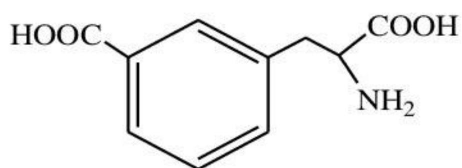
(36)



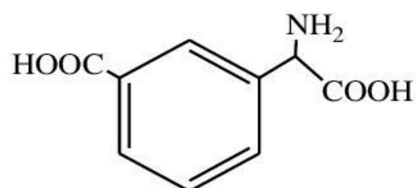
(37)



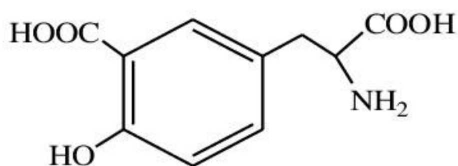
(38)



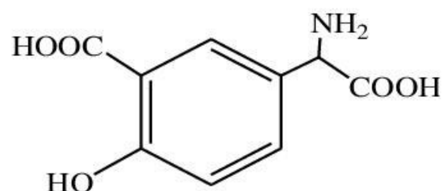
(39)



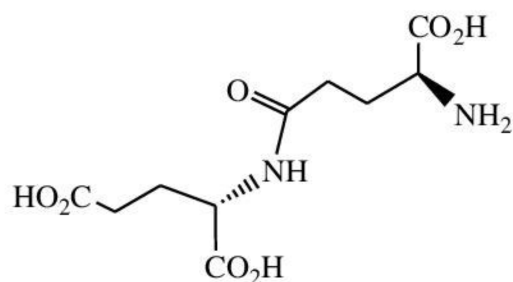
(40)



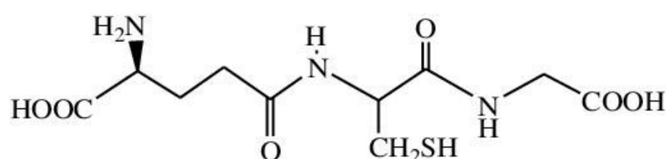
(41)



(42)

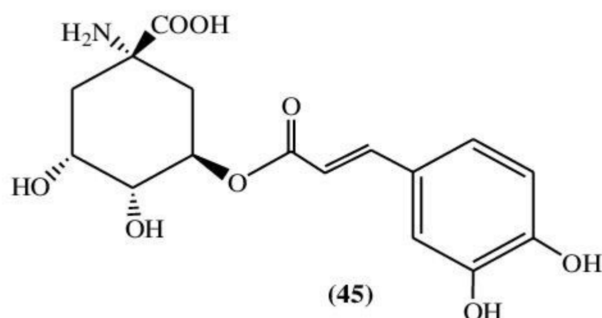


(43)

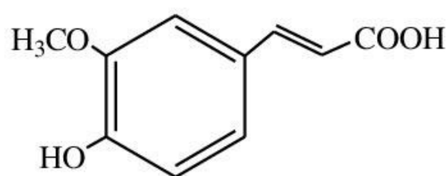


(44)

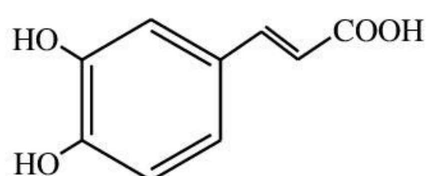
En plus des neuf flavonoïdes isolés de l'extrait éthanolique des parties aériennes de l'espèce *Reseda muricata*, Nabil H. El-Sayed et collaborateurs [8], ont isolé les cinq acides suivants : l'acide chloroginique (**45**), l'acide ferulique (**46**), l'acide caffeique (**47**), l'acide coumarique (**48**) et l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**49**) [8].



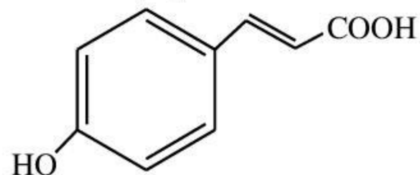
(45)



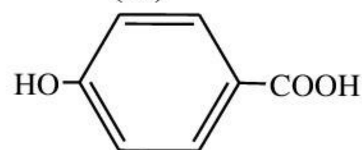
(46)



(47)



(48)



(49)

1.3.1.4 Autres composés

Diverses autres classes de produits naturels ont été identifiées. Le tableau 1.2 reporte les métabolites secondaires isolés des espèces les plus investiguées chimiquement.

Tableau 1.2 : Quelques métabolites secondaires isolés des plantes du genre *Reseda*

Type de composés	Molécules	Plantes
Alcaloïdes	HO, H, N **(50)** β-hydroxy-β-phenylethyl-N-methyl amine	*R. ducrsiva* [21] *R. muricata* [21] *R. pruinosa* [21]
	$N(CH_3)_2$, HO **(51)** Hordénine	*R. ducrsiva* [21] *R. muricata* [21]
	H, N, O, O **(52)** Résédine 5-phényl-2-oxazolidone	*R. ducrsiva* [21] *R. luteola* [42] *R. luteola* [43]

	Résédinine **(53)**	*R. luteola* [42] *R. luteola* [43]
	2-amilino-1,4-naphthoquinone **(54)**	*R. muricata* [21]
	β–hydroxy- β -phénylethyl amine (**<u>55</u>**)	*R. luteola* [42] *R. luteola* [43]
	phényl –β-naphthylamine (**<u>56</u>**)	*R. luteola* [42] *R. lutea* [44]
	Lutéanine **(57)**	*R. lutea* [44]

Tannins	**(58)** 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl-*O*-D-glucose	*R. muricata* [21] *R. ducrsiva* [21]
	(59) 6-m-digalloyl-1, 2, 3, 4-tétragalloyl-*O*-D-glucose	*R. ducrsiva* [21]
	(60) Acide 3, 4, 5, tri-*O*-galloylquinique	*R. pruinosa* [21] *R. muricata* [21]
Oxazolidinethione	**(61)** 5,5-diméthyl-2-oxazolidinethione	*R. alba* [38]
Amines	**(62)** *O*-(α-L-rhamnopyranosyloxy) benzylamine	*R. odorata* [45]

	NH$_2$ HO (63) *O*-hydroxybenzylamine	*R. odorata* [45]
Sels d'ammoniums quaternaires	OH H H$_3$C H-C—C—N$^+$—CH$_3$, Cl$^-$ H H CH$_3$ Chlorure de choline **(64)**	*R. ducrsiva* [21] *R. muricata* [21] *R. pruinosa* [21]
	OH H H$_3$C + O=C—C—N—CH$_3$, Cl$^-$ H H$_3$C **(65)** Chlorure de bétaine	*R. ducrsiva* [21] *R. muricata* [21]
Lignane	H$_3$CO 2' 1' 7' 9' OH HO 7 9 OH 5' 1 2 **(66)** OCH$_3$ OH Ent-isolariciresinol	*R. suffruticosa* [46]

1.3.2 Sur l'espèce

La recherche bibliographique exhaustive réalisée sur le genre *Reseda* en général et *Reseda alphonsii* en particulier, montre que l'espèce en question n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique.

Chapitre 2

Etude des composés terpéniques

2.1 Définition et classification

Les terpènes ou terpénoïdes constituent un groupe de lipides présentant une grande diversité structurale [47]. Cette grande classe de produits naturels qui se trouve dans les plantes, les bactéries, les archéobactéries, les champignons et les animaux [48].

Le nom générique "terpène" a été originairement appliqué aux hydrocarbures trouvés dans la térébenthine (turpentine). Le suffixe "ène" indiquant la présence de liaisons oléfiniques [47].

En 1887, Wallach a proposé la règle "isoprène" [47], développée ensuite par Ruzicka en 1921. Elle indique que les terpènes sont définis par des structures moléculaires contenant des squelettes carbonés composés d'un nombre entier d'unités isoprène (2-methylbuta - 1,3- diène). L'isoprène contient cinq atomes de carbone et par conséquent, le nombre d'atomes de carbone dans tous les terpènes est un multiple de cinq [49].

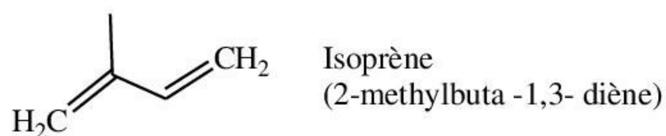


Figure 2.1 : Structure du composé isoprène

Plus de 22000 terpènes présentant une grande diversité structurale, ont été répertoriés. Bien que de structures parfois très différentes, ces molécules contiennent toutes un nombre d'atomes de carbone multiple de cinq. Les monoterpènes contiennent ainsi dix atomes de carbone; les sesquiterpènes contiennent quinze carbones; les diterpènes contiennent vingt atomes de carbone; les sesterpènes contiennent vingt-cinq atomes de carbone et les triterpènes contiennent trente atomes de carbone et ainsi de suite [48]. Certains groupes de molécules n'obéissent pas à cette règle, tels que les stéroïdes qui ne comportent que 27 carbones.

Quelques exemples de structures terpéniques :

❖ Monoterpènes C10

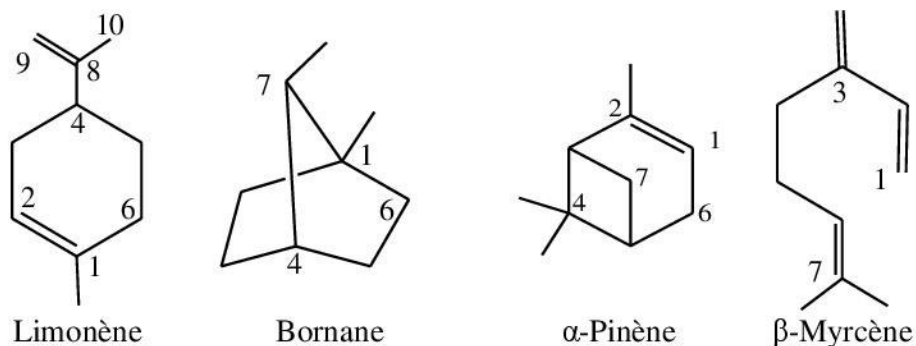


Figure 2.2 : Exemples de structures de monoterpènes

❖ Sesquiterpènes C15

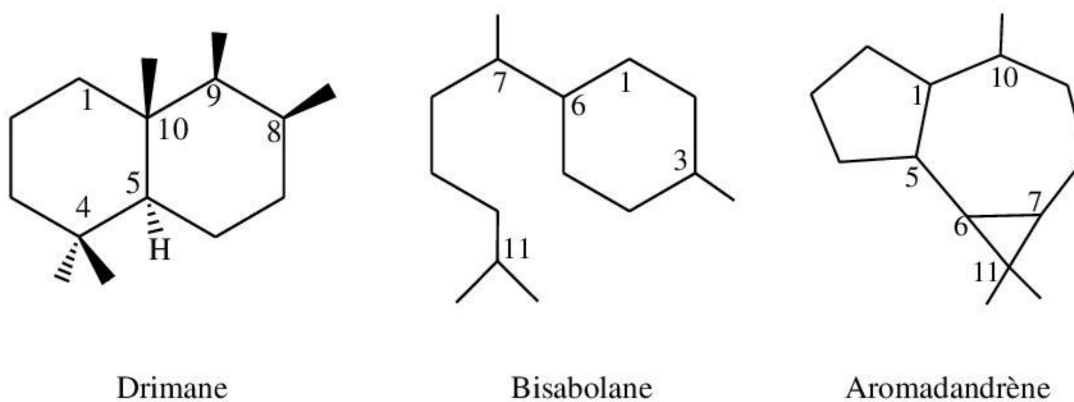


Figure 2.3 : Exemples de structures de sesquiterpènes

❖ Diterpénes C20

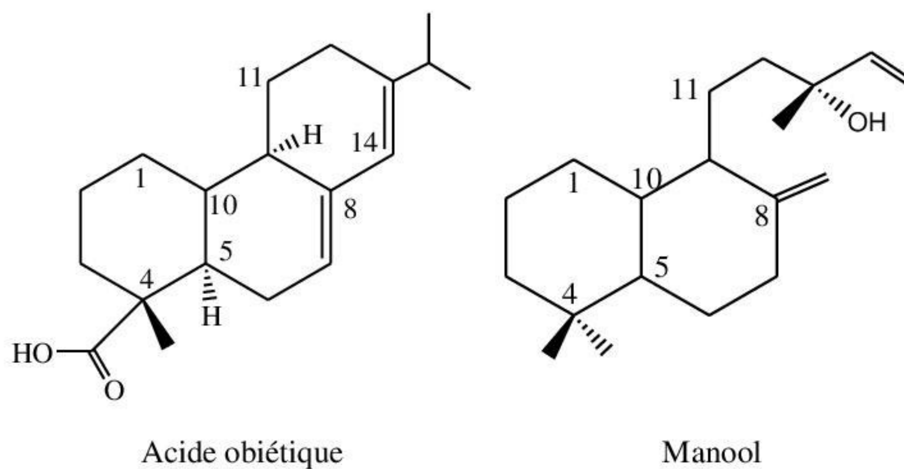


Figure 2.4 : Exemples de structures de diterpènes

- Triterpènes

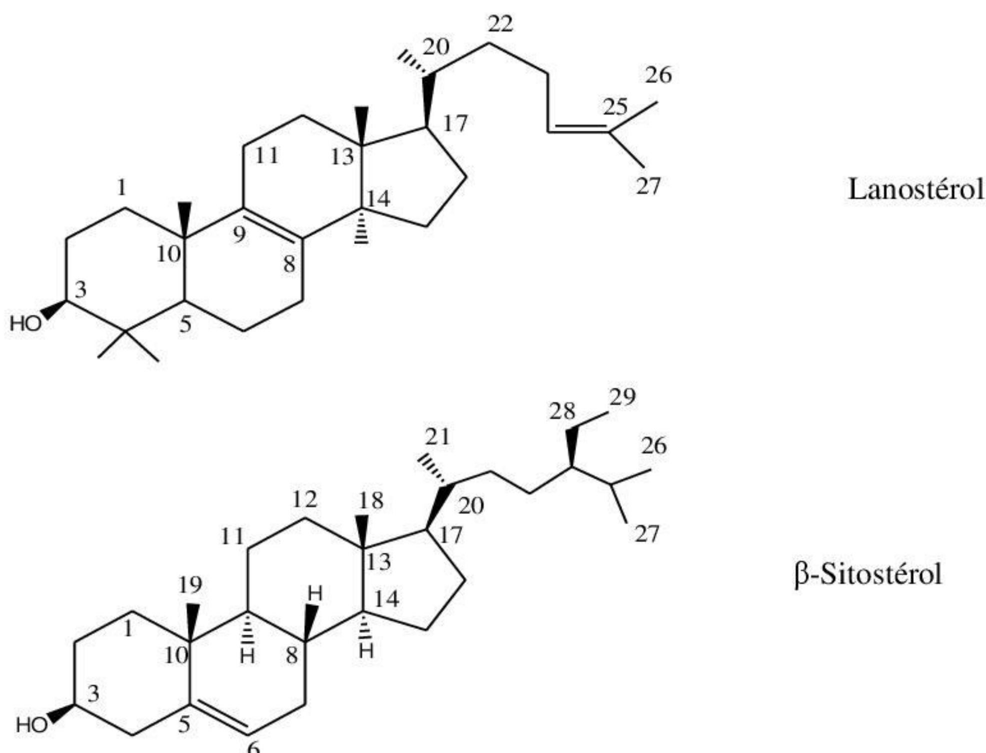


Figure 2.5 : Exemples de structures de triterpènes

2.2 Nomenclature des terpènes

La première base pour la classification est le nombre d'unités du noyau isoprène qui compose le terpène. Les noms pour ces groupes sont représentés dans le tableau 2.1 ci-dessous. La seconde dépend de la nature du squelette, à chaîne ouverte ou cyclique (un, deux ou plusieurs cycles).

Nom	Nombre d'unités isopréniques	Nombre d'atomes de carbone
Hemiterpénoïdes	1	5
Monoterpénoïdes	2	10
Sesquiterpénoïdes	3	15
Diterpénoïdes	4	20
Sesterterpénoïdes	5	25
Triterpénoïdes	6	30
Tetraterpénoïdes	8	40
Caroténoïdes	8	40
Polyisoprénoïdes	>8	>40

Tableau 2.6 : Classification des terpènes basée sur la multiplication du nombre cinq

Les familles de terpènes possédant le même squelette sont nommées à partir du membre principal de cette famille, habituellement, le plus commun ou le premier avoir été découvert. Les tableaux de ces noms sont donnés dans le dictionnaire de Scott et Devon [50].

Pour nommer un terpène individuel, il est coutumier d'utiliser les nomenclatures IUPAC (Union internationale de chimie pure et appliquée) ou CAS (Chemical abstracts service). Cependant et souvent, il s'avère plus commode d'utiliser un nom insignifiant ou un nom semi-systématique dérivé de la structure terpénique de la famille à laquelle ce produit en question appartient. Les noms insignifiants sont souvent attachés aux sources naturelles du terpène [47]. On citera le pinène isolé de l'essence de térébenthine, huile essentielle du pin.

Des lettres grecques sont utilisées de plusieurs façons pour distinguer entre les isomères terpéniques. Ils peuvent indiquer l'ordre dans lequel les isomères étaient découverts ou leur abondance relative dans l'huile. Par exemple, α-pinène est le composant primordial de l'huile de térébenthine, en comprenant habituellement presque trois quarts de l'huile par poids. Le deuxième composant par rapport à l'abondance est le β-pinène [47].



Figure 2.7 : Les deux isomères de pinène les plus abondants

Dans le cas des terpènes cycliques, les lettres α, β et γ se reportent souvent à l'emplacement de la double liaison dans les isomères oléfiniques. Dans ces cas, la lettre α indique une double liaison endocyclique trisubstituée, β une liaison oléfinique tetrasubstituée et γ une fonction méthylène exocyclique comme il est reporté dans les schémas suivants (Figure 2.8) [47].

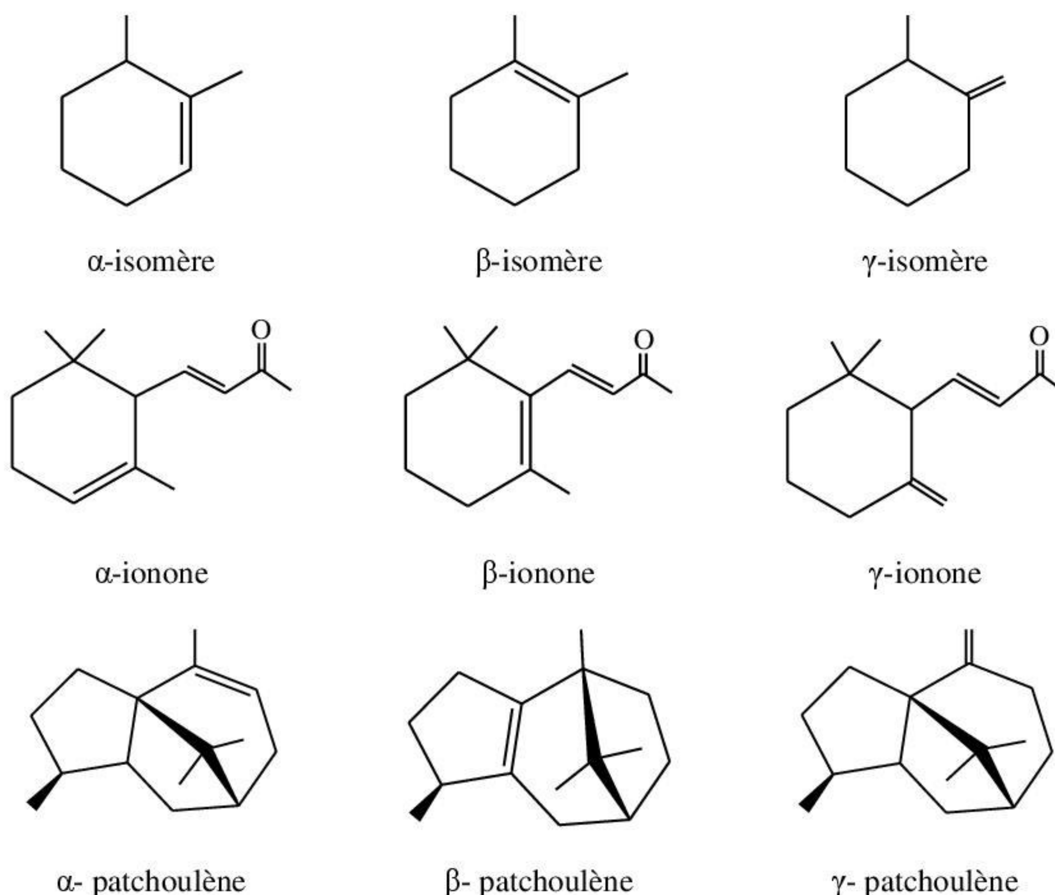
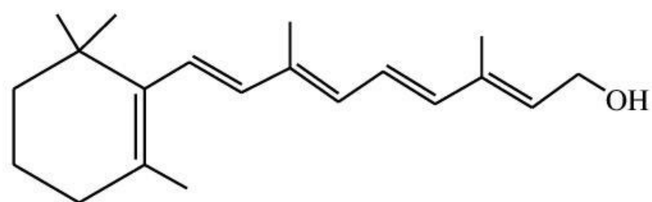


Figure 2.8 : Structures génériques des isomères ionones et patchoulènes.

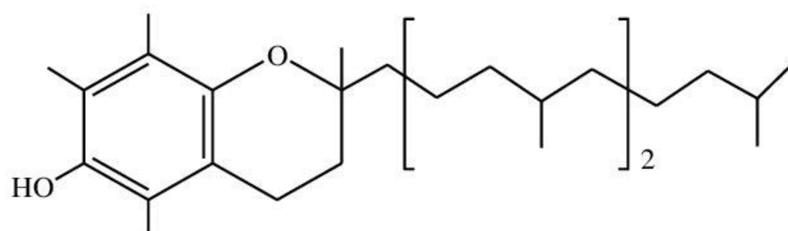
2.3 Rôle des terpènes dans la nature

Les terpènes sont produits par une large variété de plantes, animaux et micro-organismes. Comme tous les métabolites, les terpènes sont synthétisés pour jouer un rôle au niveau des organismes vivants. On peut résumer ces rôles selon trois types : fonctionnel, défense et communication [47].

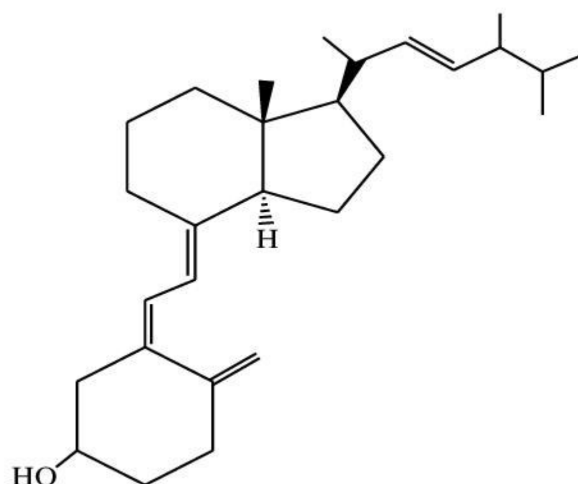
La figure 2.9 montre quelques exemples indiquant le rôle fonctionnel des terpènes. La vitamine A ou rétinol, est le précurseur du pigment qui détecte la lumière dans les yeux, et par conséquent, elle est responsable de la vue. La vitamine E ou tocophérol, est un antioxydant important qui empêche l'endommagement oxydatif des cellules. La vitamine D_2 aussi connu sous le nom de calciférol, règle le calcium métabolique dans le corps, et est par conséquent vital pour la composition et la maintenance des os. La chlorophylle A, pigment vert rencontré dans les feuilles des plantes, est un facteur clé dans la photosynthèse.



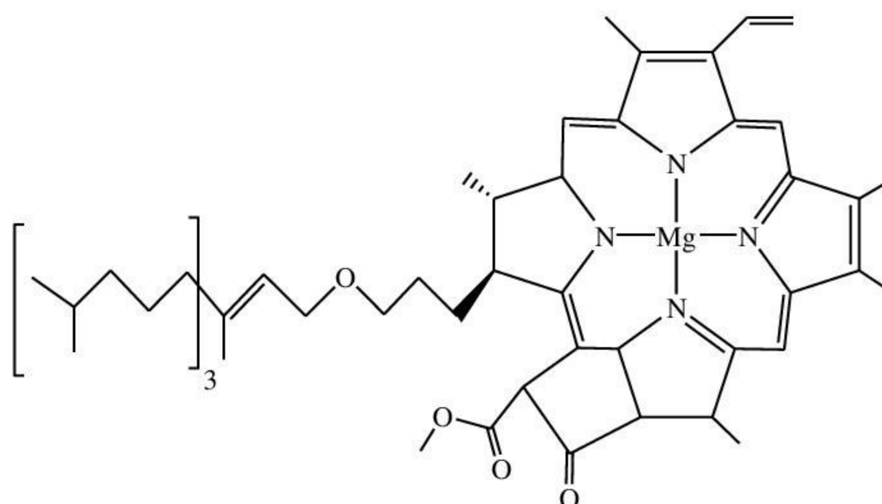
Rétinol



Tocophérol



Calciférol

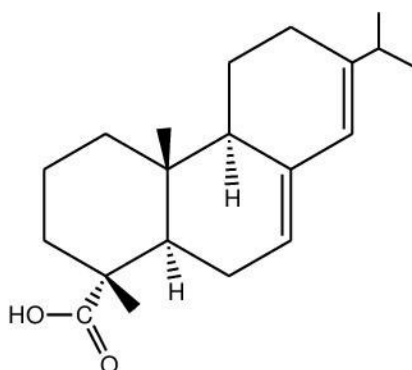


Chlorophyll-A

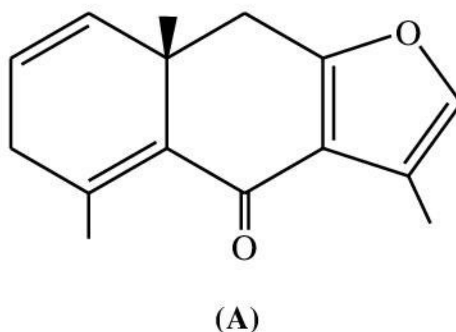
Figure 2.9 : Quelques exemples indiquant le rôle fonctionnel des terpènes.

Il y a plusieurs manières à travers lesquelles, plantes et animaux utilisent les produits terpéniques pour se protéger. Les deux manières les plus communes semblent être la production de résines par les plantes endommagées et la production de matières ou métabolites secondaires qui rendront une plante ou un animal peu attrayant pour les prédateurs [47].

Beaucoup de plantes, quand elles sont endommagées, exsudent des matières résineuses comme un mécanisme défensif. La colophane ou rosine (composée principalement de l'acide abiétique) est produite comme une barrière physique aux organismes infectieux, par les pins lorsque l'écorce est endommagé. De la même façon, le caoutchouc est une sécrétion défensive. L'arbrisseau *Commiphora abyssinica* produit une résine qui contient plusieurs composés antibactériens et fongicides. Un de ceux-ci est le dérivé de l'eudesmane (A). Le rôle de cette résine a pour but de sceller la blessure et empêcher ainsi les bactéries et les moisissures d'entrer dans la plante endommagée [47].



Acide abiétique



(A)

Figure 2.10 : Quelques terpènes constituant les résines

La bufotaline est un hétéroside cardiotonique, stimulant du cœur. Il est produit par les crapauds pour se prémunir contre les attaques d'autres animaux prédateurs. Ces

derniers arrivent à croire que les crapauds ne constituent pas une bonne nourriture. De la même façon, beaucoup de plantes produisent des terpènes pour se rendre désagréables aux insectes qui mangeraient leur feuillage. On citera pour l'exemple, l'azadirachtine produite par les espèces *Melia azadirachta* et *Azadirachta indica*, et le warburganal produit par les plantes du genre *Warburgia* (Figure 2.11) [47].

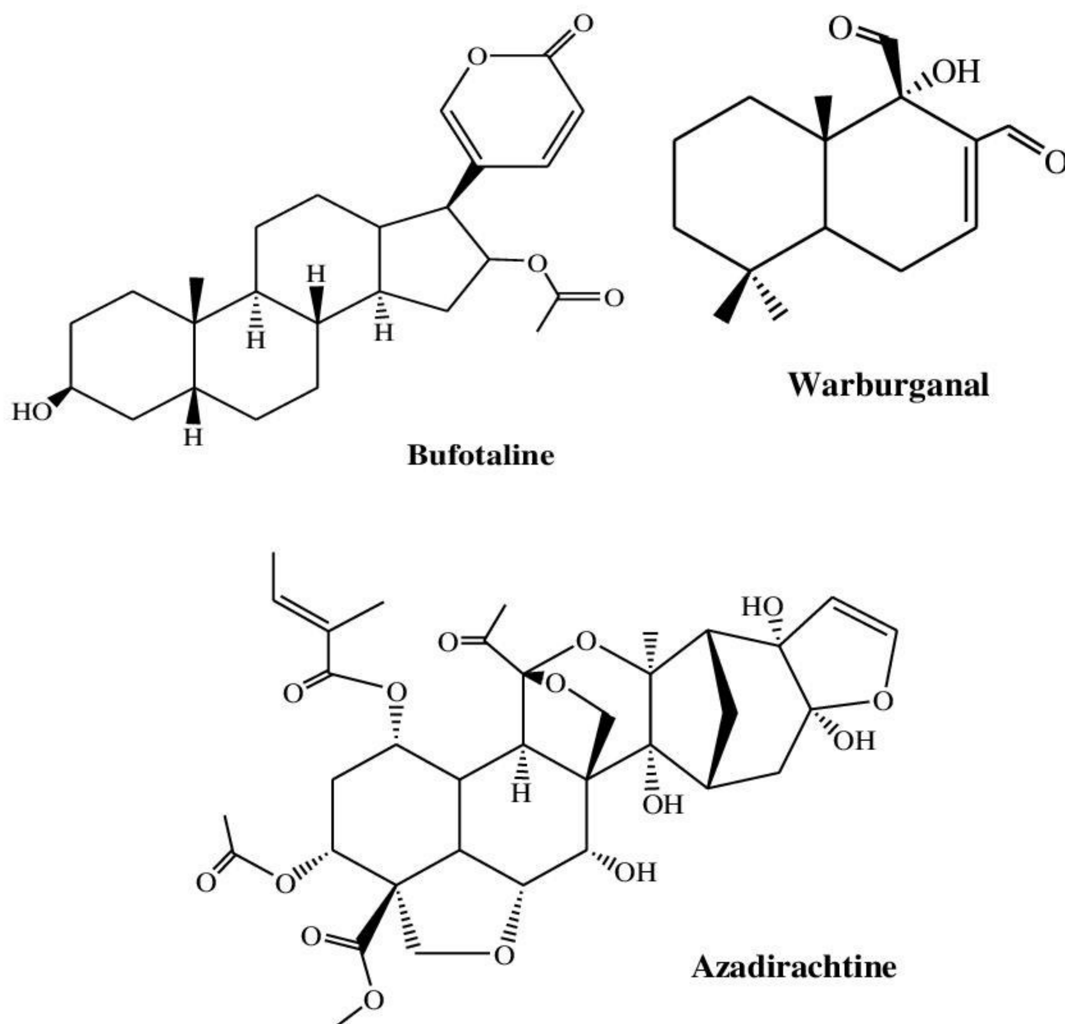


Figure 2.11: Terpènes jouant un rôle défensif dans la plante

Les terpènes sont aussi utilisés comme messagers chimiques appelés hormones. L'acide gibbérellique est une hormone utilisée par les plantes pour contrôler leur taux de croissance. La testostérone et l'œstrone sont des hormones sexuelles des mammifères (Figure 2.12) [47].

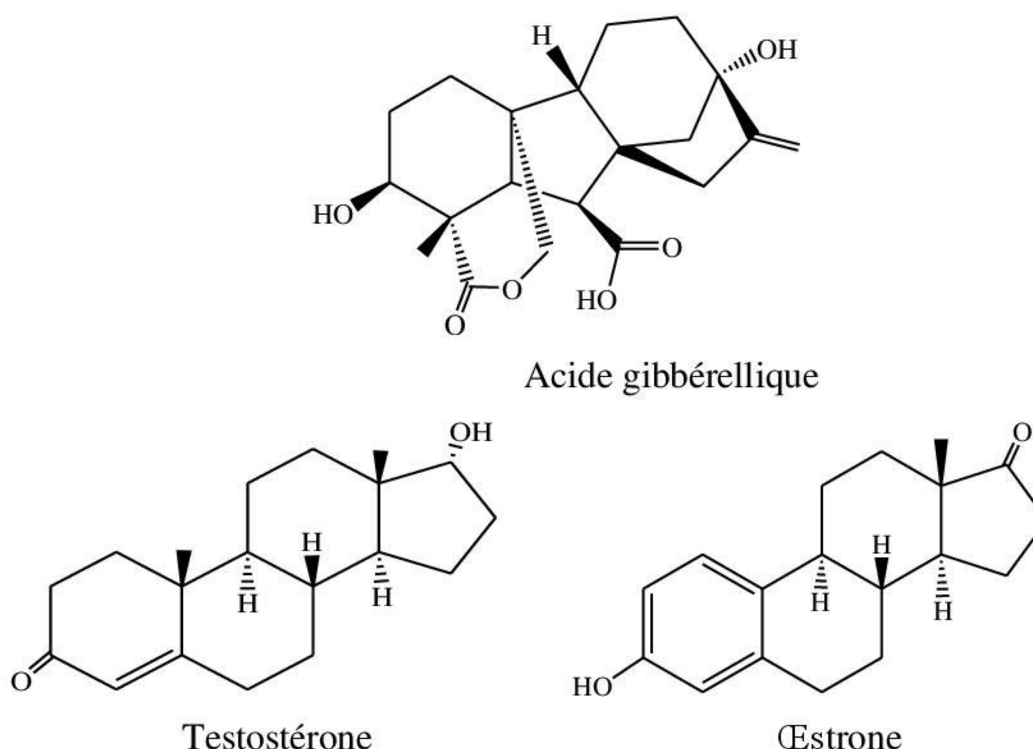
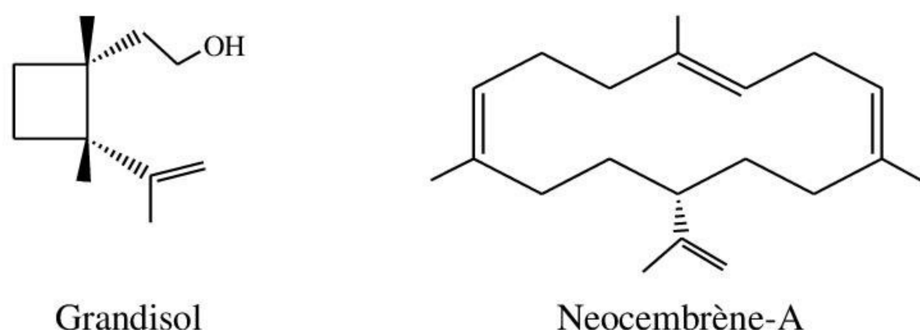


Figure 2.12 : Terpènes utilisés comme messagers chimiques (hormones)

D'autres terpènes sont utilisés comme messagers d'une même espèce d'animaux, ou plantes. Ils sont appelés phéromones. Les papillons de nuit virils peuvent détecter à longue distance, les femelles par l'odeur. Le grandisol est une phéromone mâle d'un charançon de la graine du coton, causant des pertes considérables pour les récoltes coton [47]. Les fourmis et termites utilisent des phéromones de piste pour marquer un chemin entre le nid et une source de nourriture. Cela explique pourquoi les fourmis sont souvent vues marchant en file indienne sur de longues distances. Une des phéromones de piste est la néocembrène-A qui est produite et utilisée par les termites de l'espèce australienne *Nasutitermes exitiosus* (Figure 2.13).



Grandisol Neocembrène-A

Figure 2.13 : Terpènes utilisés comme phéromones

La production de camphre et de *d*-limonène, protège les arbres contre les attaques d'insectes. Le myrcène, produit par le pin de ponderosa (*Pinus ponderosa*), attire les femelles du coléoptère de l'écorce nommé *Dendroctonous brevicomis*. Le géraniol, rencontré dans le parfum de beaucoup de fleurs comme la rose, attire les insectes aux fleurs [47].

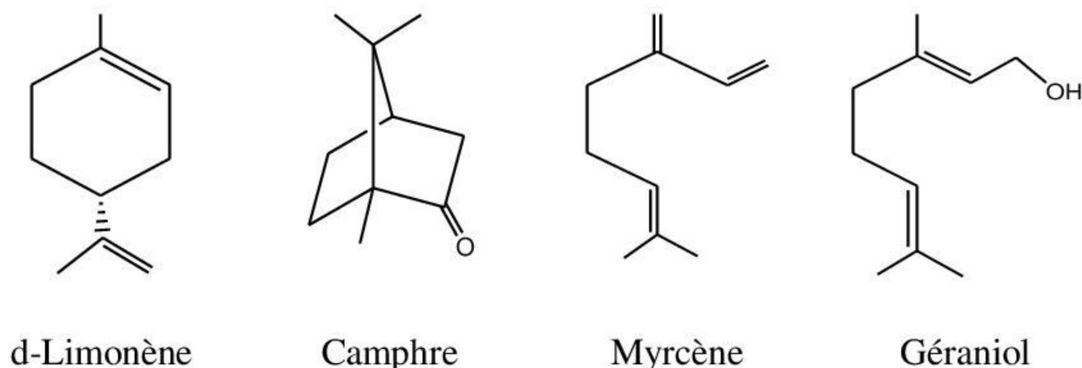


Figure 2.14 : Terpènes utilisés comme messagers chimiques entre des espèces différentes

2.4 Biosynthèse des terpènes

Bien que la règle dite "isoprène" établie en 1920 par Ruzicka pour l'élucidation des structures, l'origine biosynthétique de l'unité C5 était inconnue. Maintenant, il apparait qu'il y a deux voies majeures, l'une basée sur l'acide mévalonique (AMV) et l'autre sur le 1-désoxy-xylulose phosphate (DXP) [49].

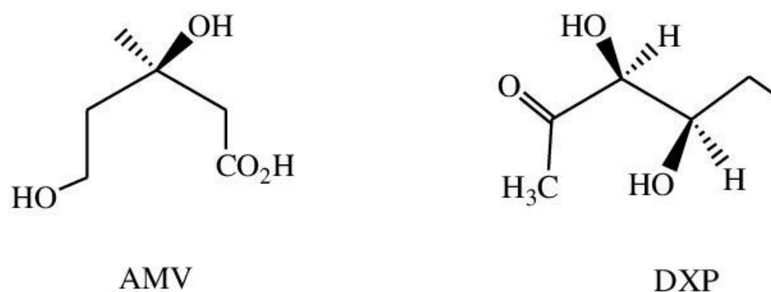


Figure 2.15 : L'acide mévalonique et le 1-désoxy-xylulose phosphate

La biosynthèse des terpènes se fait en quatre étapes [49] :

1- Formation de l'unité de base isopentényl diphosphate, appelée aussi isopentényl pyrophosphate ou IIP.

2- Association de ces unités isopréniques pour former les squelettes des différentes familles de terpénoïdes. Ces unités peut être associées via un couplage "tête à queue"

conduisant à la formation des mono-, sesqui-, di-, sester- et polyterpènes, et un couplage "queue à queue" des unités en C-15 et C-20 permettant l'élaboration des triterpènes et carotènes.

3- Cyclisation des squelettes produits lors de l'étape précédente.

4- Enfin, différentes réactions de réarrangements, hydroxylations et oxydations conduisant aux structures finales des terpènes.

L'isopentényl diphosphate est synthétisé biologiquement selon deux voies différentes en fonction de la nature de l'organisme et de la structure du terpène final. Chez les animaux et les plantes supérieures, les sesquiterpènes et les triterpènes proviennent principalement du mévalonate, alors que les mono-, di- et tétraterpènes sont synthétisés à partir du 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate. Chez les bactéries, les deux voies sont utilisées [48, 51].

2.4.1 Synthèse de l'isopetényl diphosphate par la voie mévalonate

La voie biosynthétique des terpènes par la voie du mévalonate [48, 52], débute par la transformation de l'acétate en acétyl-CoA, suivie d'une condensation de Claisen conduisant à l'acétoacétyl-CoA. Une seconde réaction de condensation avec une troisième molécule d'acétyl-CoA génère le 3-méthylglutaryl-CoA qui est ensuite réduit en mévalonate. Plusieurs réactions de phosphorylation, suivies de l'élimination simultanée de CO_2 et d'un ion phosphate, conduisent au produit final.

La première étape irréversible de la biosynthèse est la condensation de l'acétyl-CoA avec l'acétoacétyl-CoA, pour former le **3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA** (HMG-CoA). Cette réaction est catalysée par une enzyme, l'HMG-CoA synthase.

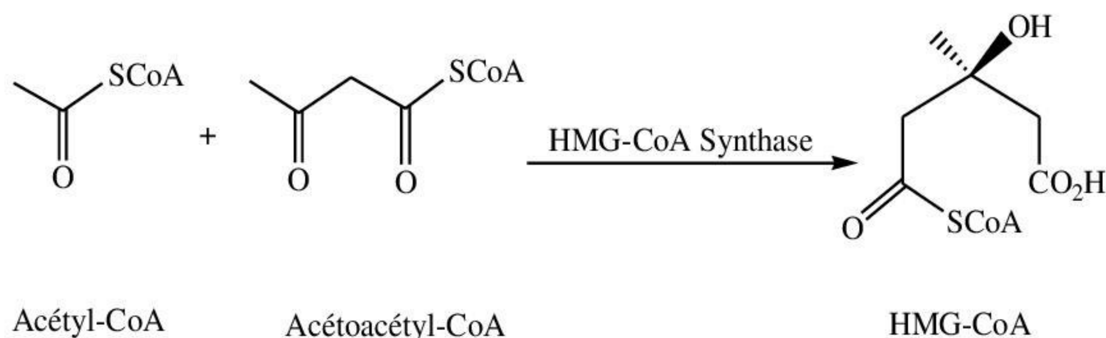


Figure 2.16 : Formation de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA)

La déacétylation de l'HMG-CoA conduisant à l'acide mévalonique (MVA), par une catalyse réductive, fait intervenir le NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, cofacteur d'oxydoréduction) et l'enzyme HMG-CoA réductase (HMGR).

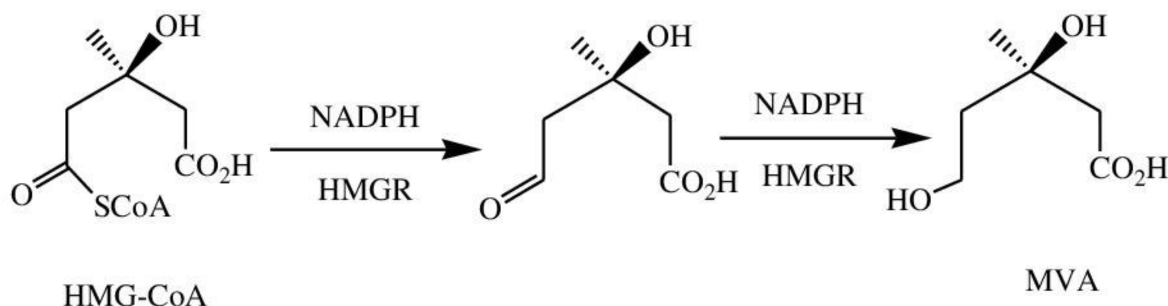


Figure 2.17 : Formation de l'acide mévalonique (MVA)

La mévalonate kinase (MK), une enzyme dimérique, catalyse ensuite la première phosphorylation ATP-dépendante. Cette enzyme transforme le mévalonate en mévalonte-5-phosphate. Ce dernier est à nouveau phosphorylé conduisant au mévalonate-5-diphosphate. La réaction est catalysée par l'enzyme phosphomévalonate kinase (PMK) en présence d'un ion divalent, souvent l'ion Mg^{2+}.

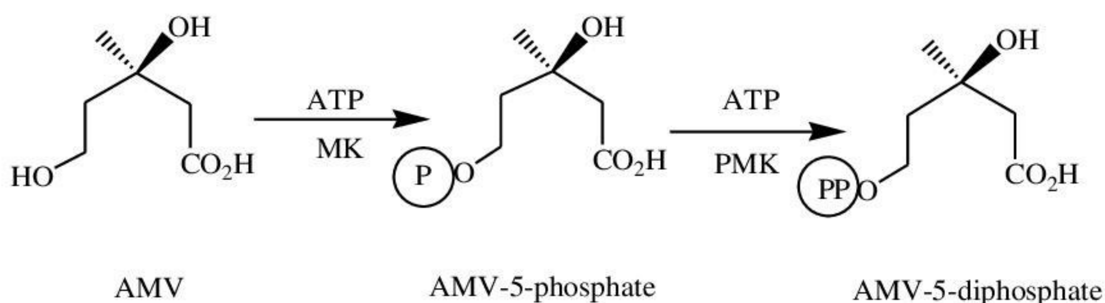


Figure 2.18 : Diphosphorylation de l'acide mévalonique

La *trans* élimination de l'hydroxyle tertiaire et le carboxyle conduit à la formation de 3-méthylbut-3-ényl pyrophosphate (isopentényldiphosphate, IPP). Ce dernier est considéré avec son isomère 3-méthylbut-2-ényl pyrophosphate (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) comme étant des unités isoprènes biogénétiques. L'enzyme intervenant dans la production de l'IPP est le mévalonate-5-diphosphate décarboxylase (MDD).

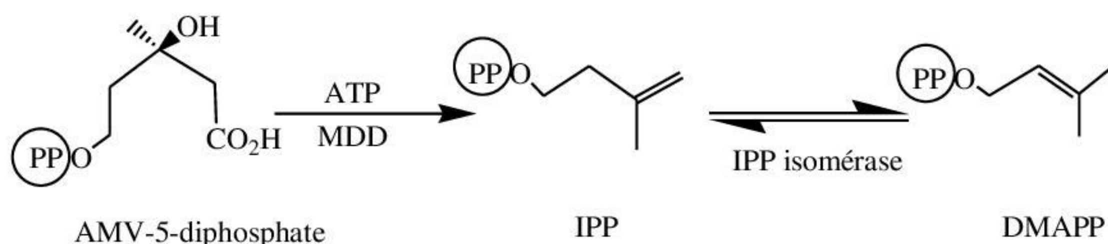


Figure 2.19 : Formation de l'IPP et son isomère DMAPP

2.4.2 Synthèse de l'isopetényl diphosphate par la voie du 1-déoxyxylulose phosphate

La biosynthèse des terpènes par la voie du mévalonate est connue depuis de nombreuses années et a fait l'objet de nombreuses études très détaillées. Par contre, la voie du désoxylulose phosphate (DXP) aussi appelée voie du méthylérythritol phosphate, n'a été découverte qu'en 1993. De nombreuses études sont encore en cours afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette voie métabolique [48, 53, 54].

On peut résumer les principales étapes comme suit [48] :

L'isopentényl diphosphate est produit par la voie du DXP par le couplage initial de deux molécules à trois atomes de carbone, le pyruvate et la glycéraldéhyde-3-phosphate, avec perte de CO_2. La réaction est catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase et nécessite la participation du coenzyme thiamine diphosphate, un dérivé de la vitamine B_1.

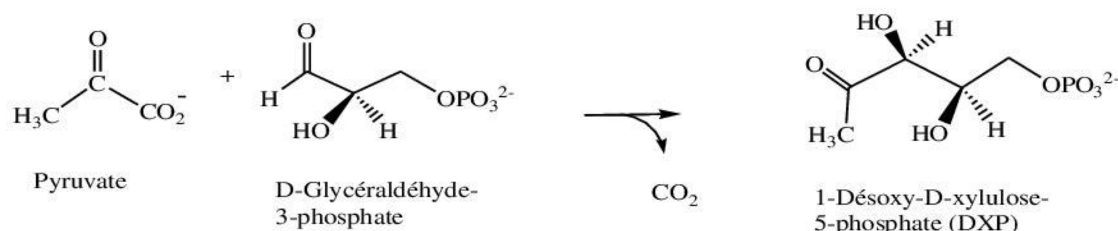


Figure 2.20 : Formation de DXP à partir de pyruvate et la glycéraldéhyde-3-phosphate

Un réarrangement permet de modifier le squelette carboné de la molécule avant la réduction du groupe carbonyle par le NADPH.

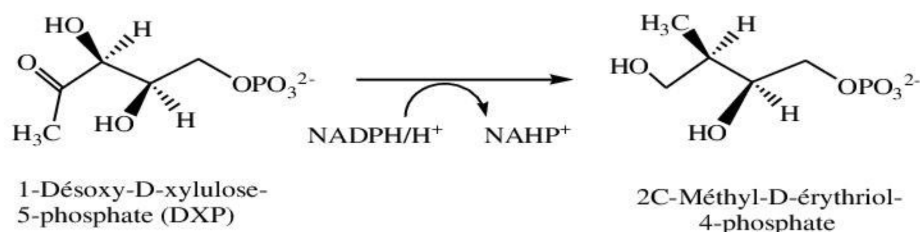


Figure 2.21: Formation de 2C-Méthyl-D-éthriol-4-phosphate à partir de DXP

Le 2C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate réagit ensuite avec la cytidine triphosphate (CTP). Le diphosphocytidylméthylérythritol qui se forme est ensuite phosphorylé par l'ATP. Finalement, une réaction de cyclisation libérant la cytidine monophosphate conduit à la formation du 2C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate [48, 55, 56].

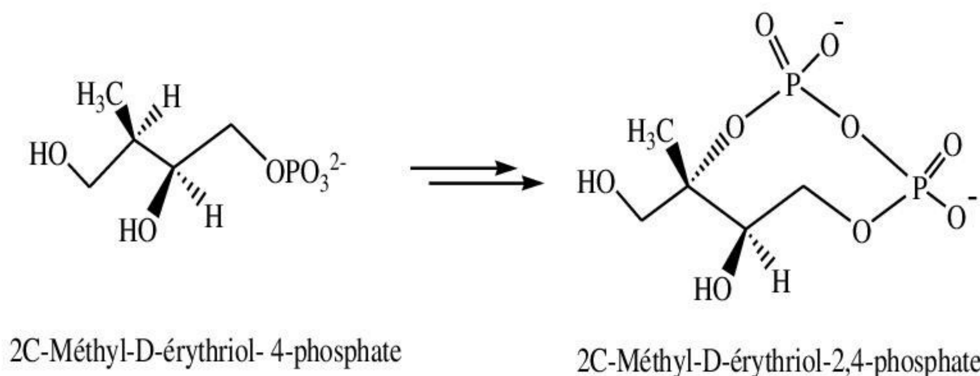


Figure 2.22 : Formation du 2C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate

Peu de choses sont connues sur les mécanismes et les intermédiaires mis en jeu au cours de la transformation ultérieure du 2*C*-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate en isopenténlyle diphosphate. Il semble cependant que des réactions, faisant intervenir des centres fer-soufre, soient impliquées et l'une des hypothèses avancées suggère que le cyclodiphosphate est converti en époxyde avant d'être désoxygéné puis réduit [48].

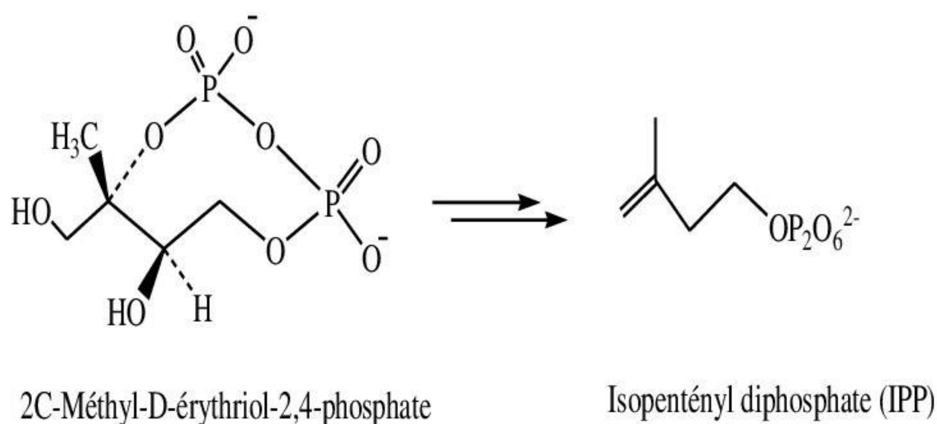


Figure 2.23 : Formation de l'isopenténlyl diphosphate (IPP)

Une stéréospécifique et réversible isomérisation de la double liaison de l'IPP produit l'isomère DMAPP. Le résultat de cette isomérisation est la création d'un pyrophosphate allylique réactif, qui joue un rôle important dans la condensation des unités isoprènes [49].

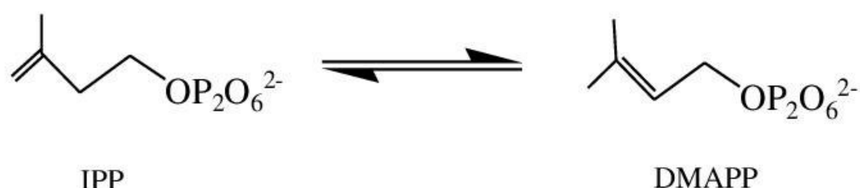


Figure 2.24 : Isomération de l'IPP et formation de DMAPP

Par l'intermédiaire de l'enzyme prényltransférase, deux unités isoprènes à cinq atomes de carbone se combinent ensuite pour former un produit en C_{10}, le géranyl diphosphate (GPP). Ce dernier peut réagir avec une nouvelle molécule d'IPP pour conduire au farnésyl diphosphate (FPP) en C_{15} et ainsi de suite jusqu'à C_{25}. Les triterpènes (C_{30}) et les tétraterpènes (C_{40}) sont syntéthisés par dimérisation d'unités en C_{15} (FPP) ou en C_{20} (GGPP) respectivement [49]. Les triterpènes et les stéroïdes sont le résultat de la dimérisation réductrice du farnésyl diphosphate en squalène [49].

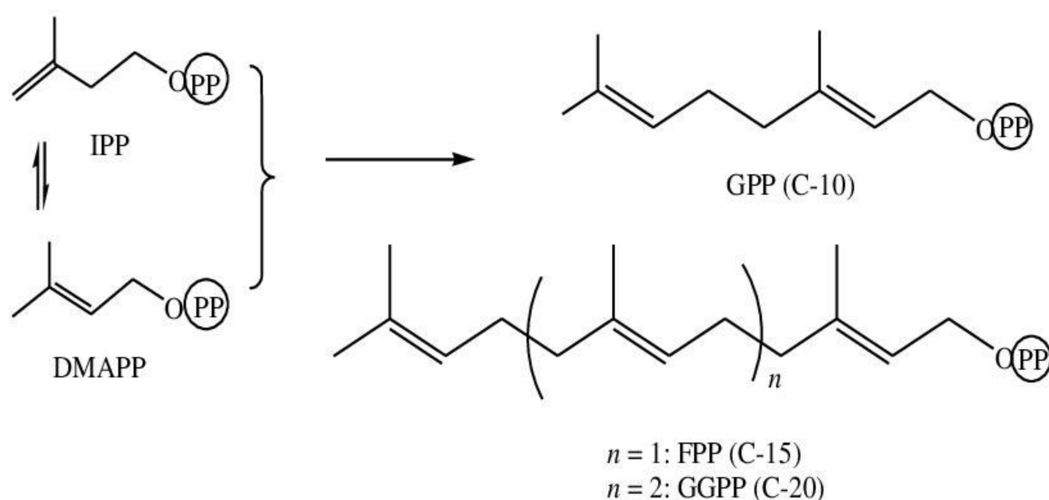


Figure 2.25 : Formation de GPP, FPP et GGPP à partir de l'IPP et le DMAPP

Ces trois prényl-pyrophosphates acycliques subissent de nombreux réarrangements pour conduire aux squelettes carbonés parents de chaque classe de terpènes. Ainsi, le GPP permet la formation des monoterpènes. Le FPP conduit aux sesquiterpènes et triterpènes et enfin le GGPP aux diterpènes et tétraterpènes [49].

2.5 Biosynthèse des triterpènes

Un couplage "queue à queue" de deux unités en C-15, farnésyl pyrophosphate (FPP) mène à la formation d'un composé en C-30 appelé squalène [57]. Ce dernier est oxydé en 2,3-époxysqualène, qui constitue le point de départ commun pour les réactions de cyclisation lors de la biosynthèse des triterpènes [58, 59].

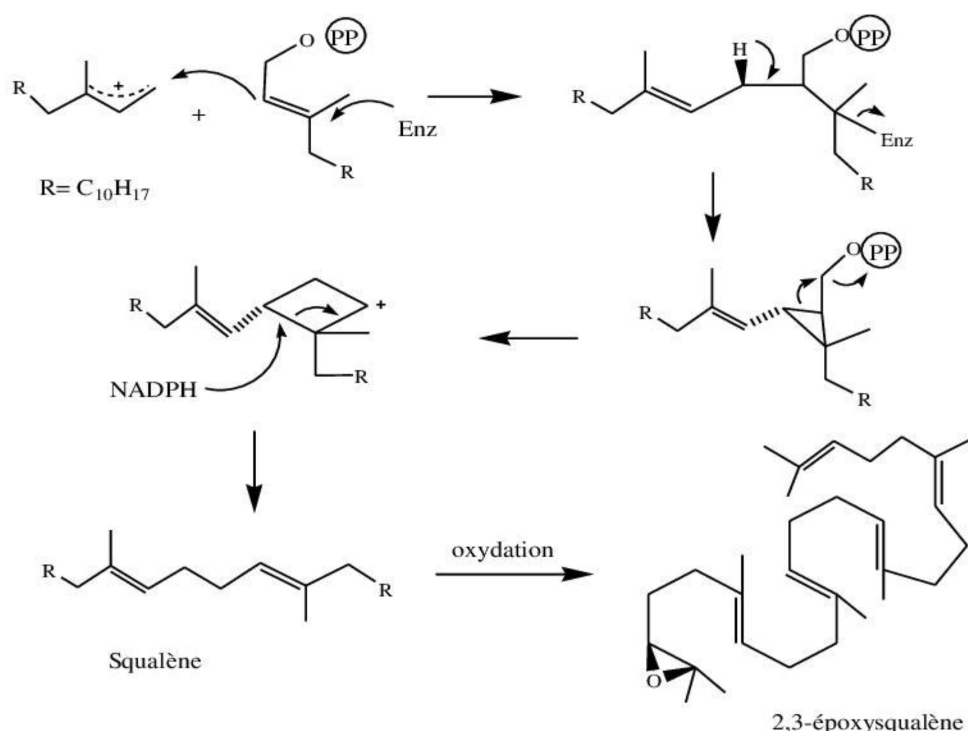


Figure 2.26 : Formation de 2,3-époxysqualène

L'époxysqualène est converti en dérivés cycliques par une protonation et l'ouverture du cycle époxyde, créant un carbocation qui peut subir plusieurs types de cyclisation [58, 59].

Après ces cyclisations, une suite de réarrangements se fait selon différentes voies par une série de changements de l'hydrogène et/ou migrations du méthyle, ce qui mène à la formation de nouveaux carbocations. Finalement, les carbocations sont neutralisés par élimination d'un proton pour donner une double liaison ou un cyclopropane, ou en réagissant avec l'eau pour donner un groupement hydroxyle [58, 59].

Le type d'enzyme cyclase impliqué à l'origine de la réaction de cyclisation détermine le squelette formé. Différents genres de cyclases ont été décrits, et leurs mécanismes d'action sont bien décrits. On peut citer par exemple le cycloarténol synthase, lanostérol synthase et β-amyrine synthase [58, 59 et 60].

La cyclisation de l'époxysqualène peut procéder par deux modes, la conformation "chaise-chaise-chaise-bateau" et la conformation "chaise-bateau-chaise-bateau". Une différence importante entre les squelettes résultants est liée à la stéréochimie, laquelle est clairement observée par la configuration en C-8 et C-14.

Après la cyclisation via la conformation "chaise-chaise-chaise-bateau", le groupe méthyle lié au carbone C-8 est pointé vers le haut et celui lié au carbone C-14 vers le bas. Le contraire est observé lors de la cyclisation via la conformation "chaise-bateau-chaise-bateau" [60].

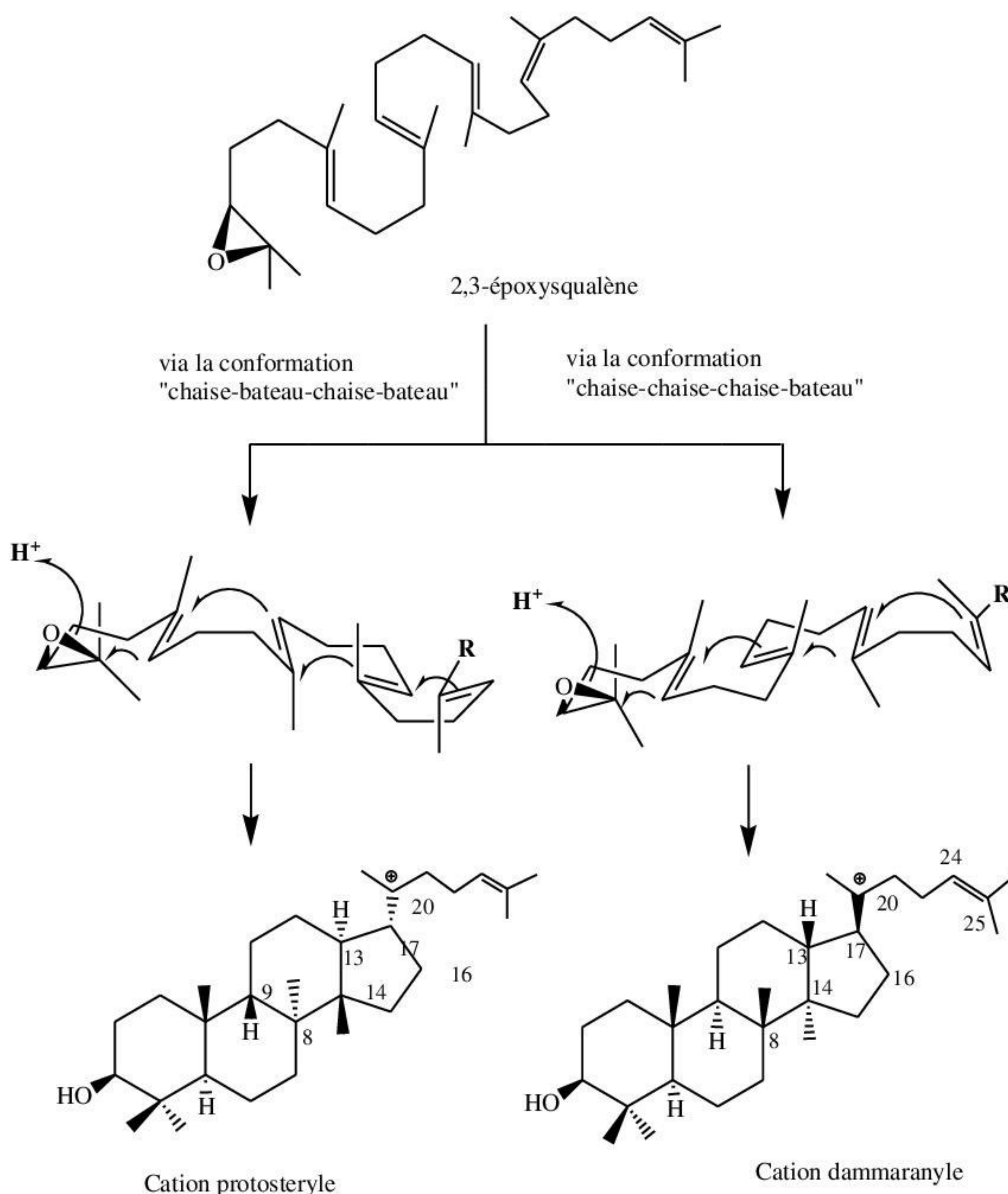


Figure 2.27 : Cyclisation du 2,3-époxysqualène via les deux modes connus

Si l'époxysqualène est dans une conformation "chaise-bateau-chaise-bateau", la cyclisation conduit à un cation protostéryle précurseur des cycloartanes, lanostanes, cucurbitanes et stéroïdes.

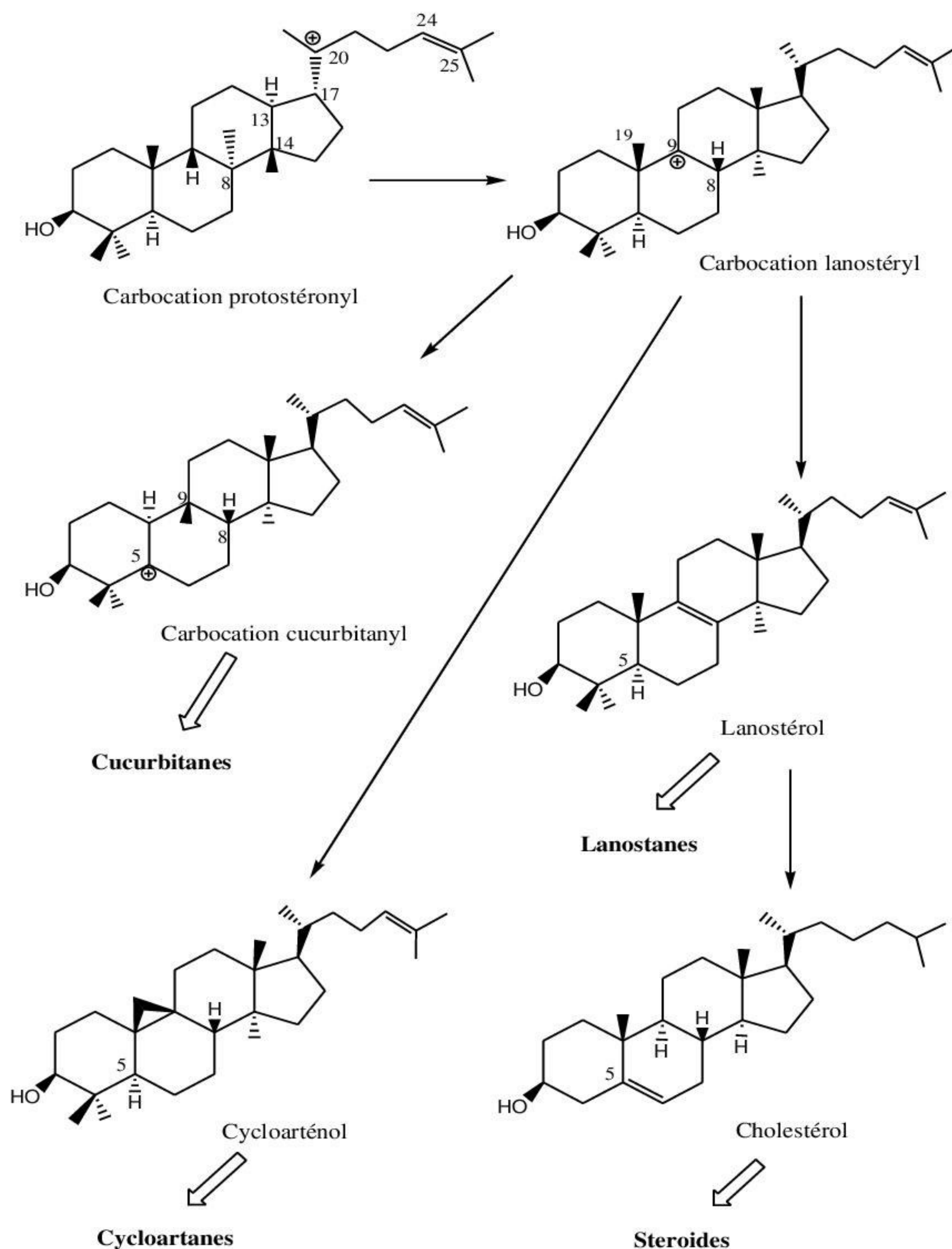


Figure 2.28 : Déférents composés résultants de la cyclisation de l'époxysqualène via la conformation "chaise-bateau-chaise-bateau"

Si la conformation de l'époxysqualène est "chaise-chaise-chaise-bateau", la cyclisation aboutit à un autre cation appelé dammaranyle. Ce dernier peut évoluer afin de donner naissance aux triterpènes tétracycliques à squelette dammarane et tirucallane. Le plus souvent, il coduit aux triterpènes pentacycliques de type lupane, hopane, ursane, oléanane, taraxasterane,…etc.

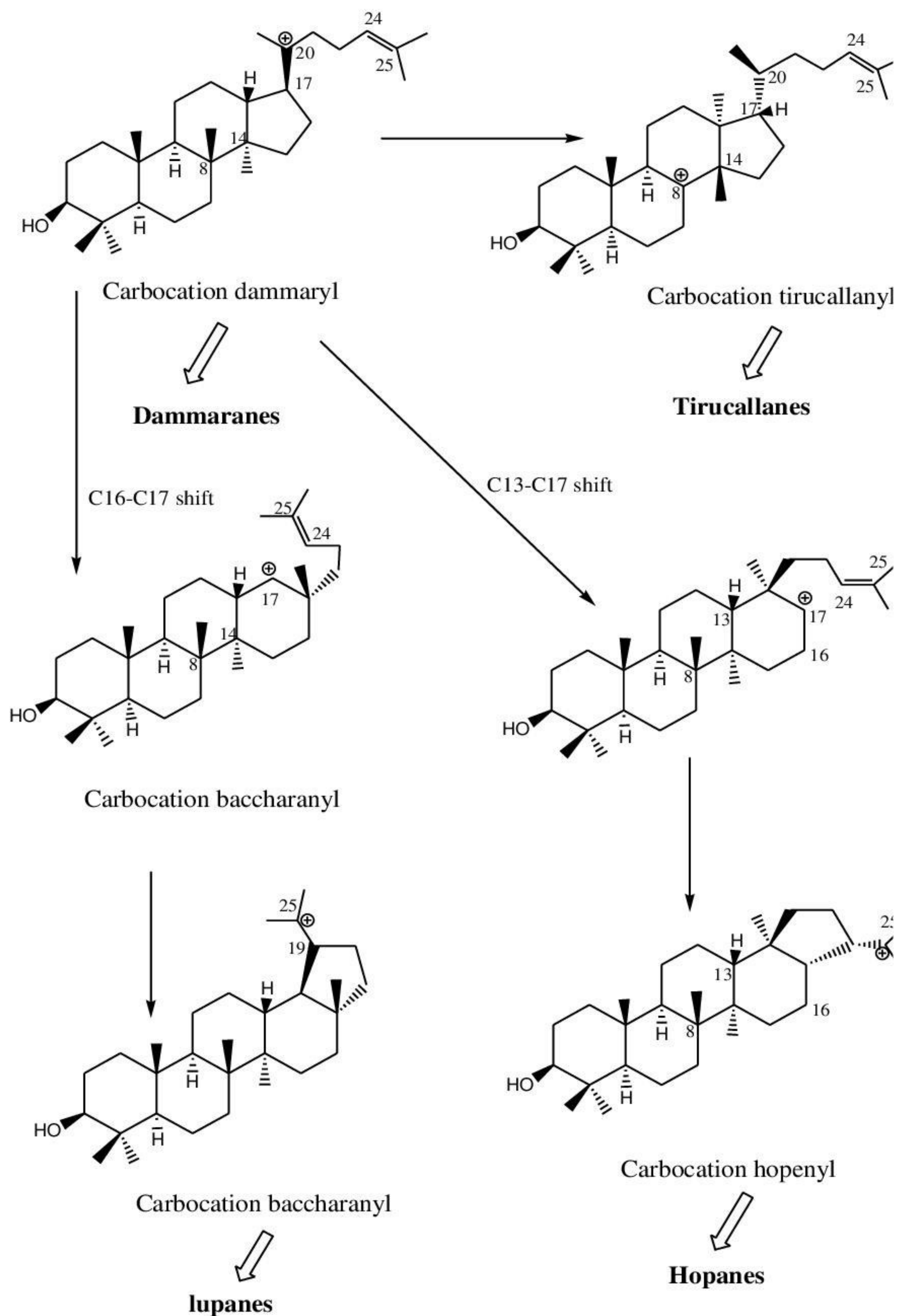


Figure 2.29 : Déférents composés résultants de la cyclisation de l'époxysqualène via conformation "chaise-chaise-chaise-bateau"

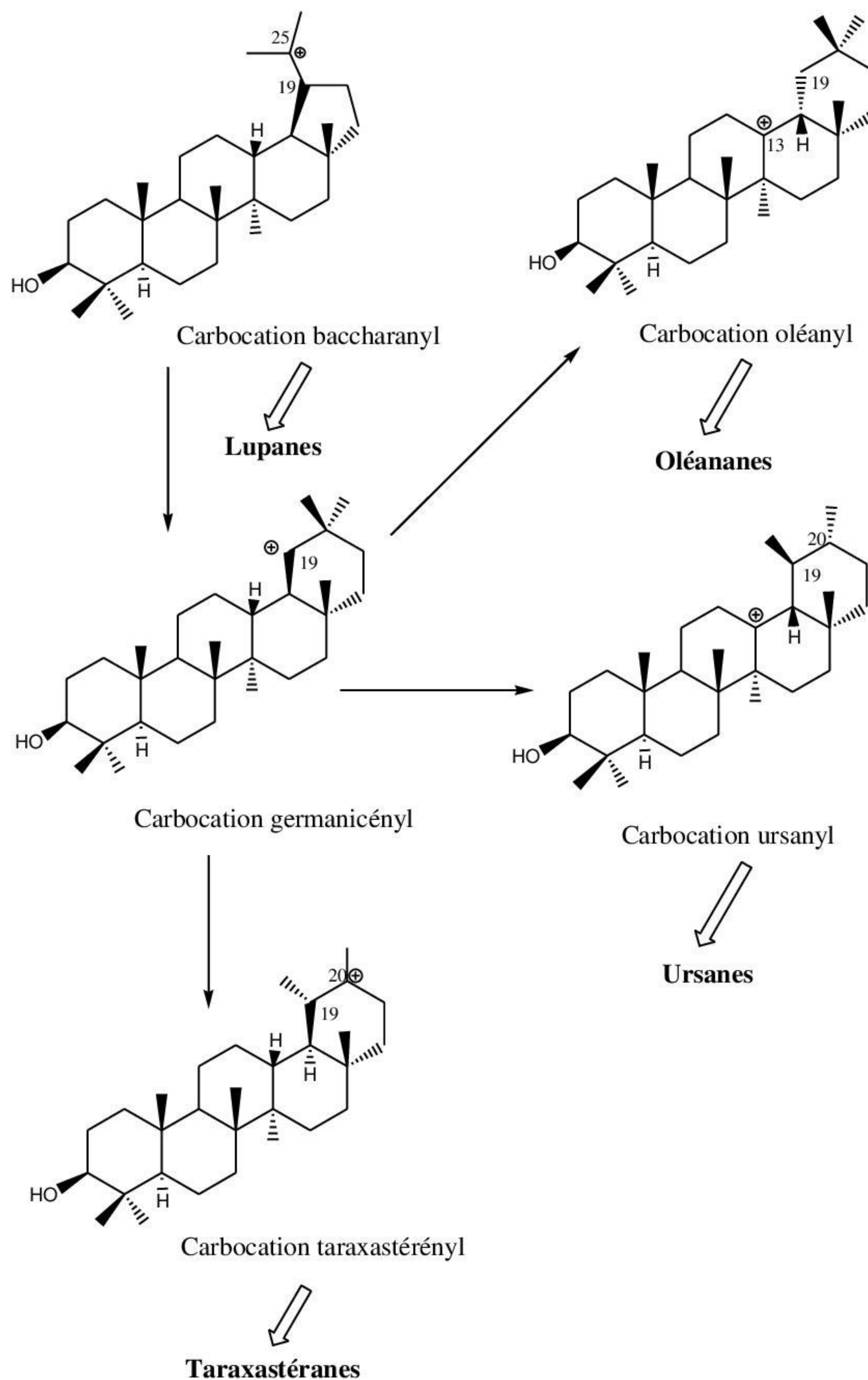


Figure 2.29 (suite) : Déférents composés résultants de la cyclisation de l'époxysqualène via la conformation "chaise-chaise-chaise-bateau"

2.6 Intérêt des terpènes

Beaucoup de terpènes naturels, en raison de leurs activités biologiques, sont utilisés comme médicaments pour le traitement de diverses maladies [61], voire pesticides. La α-santonine, par exemple, isolée à partir de l'espèce *Artemisia maritima,* est utilisée comme anthelminthique, agissant contre les infections parasitaires [53]. La digitoxine, glucoside de la digitoxigénine, isolé de *Digitalis purpurea*, est utilisée dans le traitement de certaines affections cardiaques. L'artemisinine, isolée de l'espèce *Artemisia annua*, a été recommandé récemment par l'Organisation Mondiale de la Santé pour le traitement des tendances résistantes de la malaria [49].

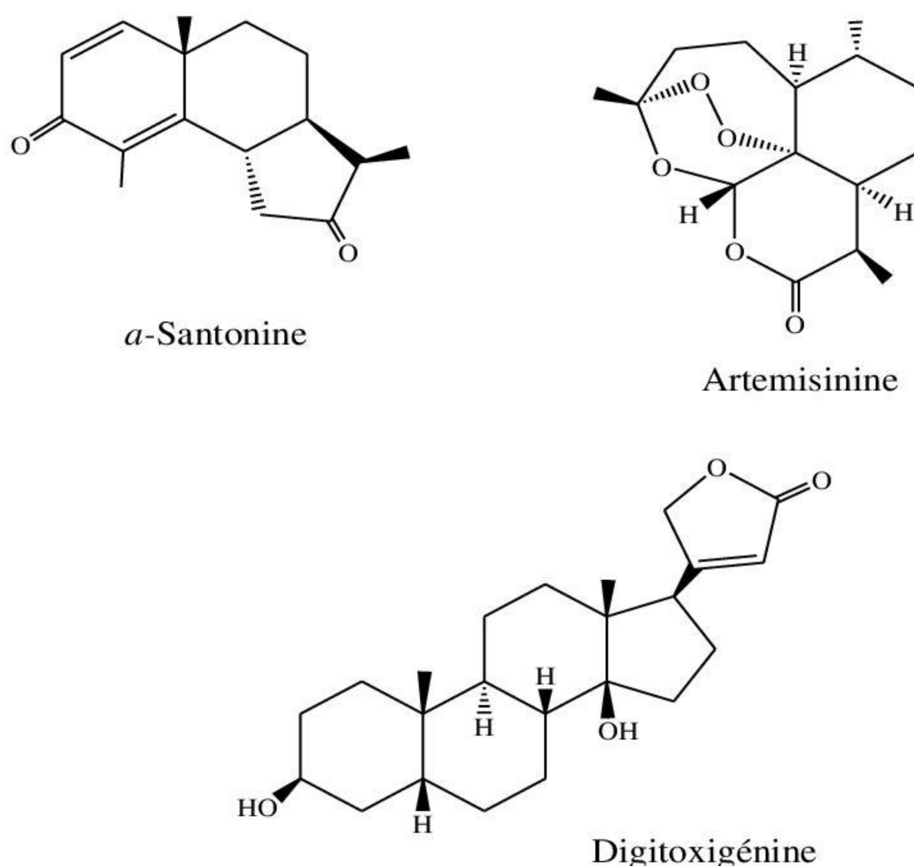


Figure 2.30 : Terpènes avec activités biologiques différentes

Les terpènes odorants sont utilisés comme ingrédients des parfums, dans les cosmétiques et les articles de toilette. Le cinéol, extrait de plusieurs espèces de l'eucalyptus, utilisé dans la parfumerie et comme un décongestif nasal naturel. Le menthol, trouvé dans l'huile essentielle de la menthe des champs, *Mentha arvensis,* possède des effets rafraîchissants. C'est également un anesthésique local, utilisé également pour parfumer les sucreries, tabac et dentifrice [49].

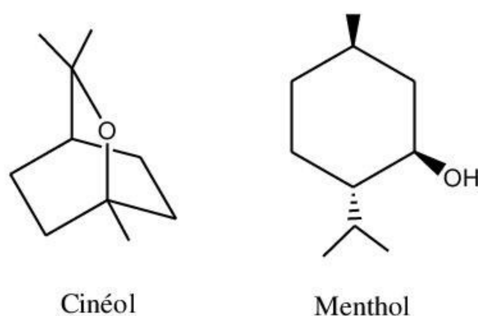


Figure 2.31 : Structure de cinéol et menthol

Les terpènes sont utilisés, jusqu'à maintenant, pour leurs propriétés physiques ou chimiques. Le caoutchouc, polymère isoprénique produit par l'hévéa comme une sécrétion défensive, est largement utilisé à cause de ses propriétés élastiques. La térébenthine a une longue histoire d'usage comme dissolvant pour les peintures en particulier, et comme résine pour les laques et vernis [49].

Près de 5000 triterpènes naturels sont reportés dans la littérature [61]. Bien que l'utilisation médicinale de cette classe de composés est plutôt limitée, de considérables et récents travaux mettent en évidence leur grand potentiel en tant que médicaments, au vu de leurs propriétés thérapeutiques aussi diverses qu'intéressantes [61]. On citera, à titre d'exemple, les propriétés thérapeutiques suivantes :

- Analgésiques et anti-inflammatoires, observées dans des mélanges de composés triterpéniques de type α et β-amyrine rencontrés dans l'éspèce *Buddleja globosa* [62].
- Anti-inflammatoire. L'investigation phytochimique de l'espèce *Abies chensiensis*, permet l'isolement de huit triterpène et un diterpène type abiétane. Quatre ont montré une activité anti-inflammatoire [63].
- Antivirales. Deux nouveaux terpènes ont été isolés de la plante *Perovskia atriplicifolia. L'étude reporte l'activité anti-VHB (Anti-virus hépatite B) des deux composés* [64].
- Activité cytotoxique. A partir de l'éxtrait dichloromethane des racines de l'éspèce *Drypetes hoaensis*, sept terpénoïdes ont été isolés : cinq sesquiterpènes type *hoaensis et deux* triterpènes *type* friedelane. L'activité anticancéreuse de ces métabolites a été prouvée [65].
- Antidiabétique. En effet, quatre cucurbitanes glycosilés isolés du melon amer *Momordica charantia*, présentent un certain nombre d'effets biologiques bénéfiques au diabète et à l'obésité [66].

Chapitre 3
Séparation des composés et élucidation structurale

3.1 Extraction

800 g des parties aériennes de *Reseda alphonsii* (Resedaceae), préalablement séchées et pulvérisées, sont mises à macérer successivement, pendant 48 heures, dans des solvants à polarité croissante (6 litres de chaque solvant). En premier lieu, la macération est faite dans le cyclohexane. Après filtration et évaporation du solvant, 8,50 g (rdt1,06 %) de l'extrait cyclohexanique ont été obtenus. Les marcs sont ensuite mis à macérer dans l'acétate d'éthyle . La filtration du mélange et l'évaporation du solvant ont permis d'obtenir 9,6 g (1,2 %) de l'extrait acétate d'éthyle. Enfin, la macération des marcs récupérés dans le méthanol, la filtration puis l'élimination totale du solvant ont donné 19 g (2,37 %) de l'extrait méthanolique. L'ensemble de ces opérations d'extraction est résumé dans le schéma présenté en figure 3.1.

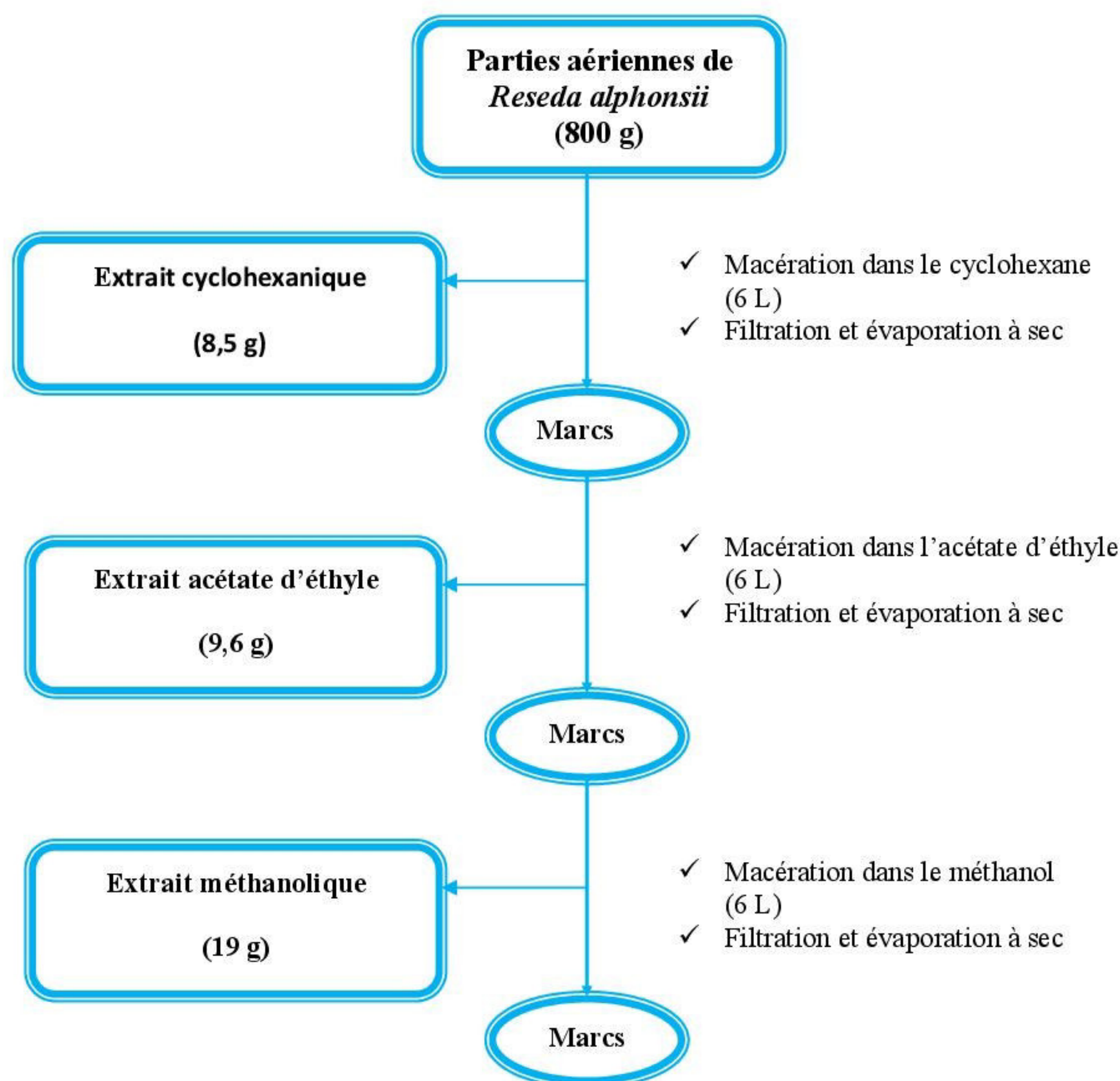


Figure 3.1: Extraction des parties aériennes de *Reseda alphonsii*

3.1.1 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes et isolement des composés A, B et C

Une chromatographie sur colonne de gel de silice normale est effectuée sur 8,5 g d'extrait acétate d'éthyle. L'élution est réalisée par le *n*-hexane pur puis un mélange de *n*-hexane-acétate d'éthyle, ensuite par un mélange acétate d'éthyle-méthanol, et enfin par du méthanol pur. A l'issue de ce fractionnement, 764 fractions ont été obtenues. L'analyse sur CCM de ces fractions, après révélation à la lumière UV (256 et 366 nm) et à la vanilline sulfurique, a permis de les rassembler en 51 lots (S1-S51).

Le lot S5 de masse égale à 106 mg est soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution, réalisée dans un mélange *n*-hexane-$CHCl_3$ à différents gradients (de 97-3 à 0-100), a permis de recueillir 30 sous-fractions (B1-B30). La sous-fraction B12 (50 mg) soumise à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale (éluant: *n*-hexane –acétate d'éthyle), a permis d'obtenir 21 autres sous fractions (C1-C21).

La purification finale de C13 (19,4 mg) par chromatographie préparative CCE en phase normale (éluant: *n*-hexane / acétate d'éthyle: 80-20) a permis d'obtenir le composé **A** pur.

Les lots S6 et S7, de masse égale à 148,3 mg, ont été chromatographiés sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution, réalisée dans un mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle à différents gradients (de 98-2 à 80-20) a permis d'obtenir 25 sous- fractions (D1-D25).

Le traitement des fractions rassemblées D7, D8 et D9, de masse égale à 19,6 mg, par des chromatographies préparatives CCE en phase normale (éluant: *n*-hexane-acétate d'éthyle: 80-20) a permis d'isoler les composés **B** et **C** à l'état pur.

3.1.2 Fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes et isolement du composé D

Un premier fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (10 g), a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice pour donner 590 fractions. L'analyse sur CCM de ces fractions, après révélation à la lumière UV (254 nm et 366 nm) et à la vanilline sulfurique, a permis de les rassembler en 45 lots (M1-M45).

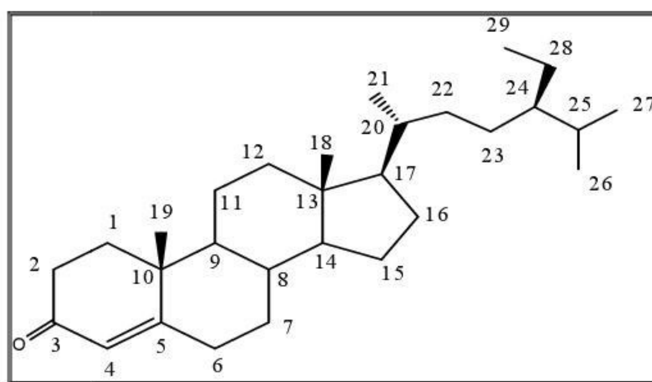
L'élution est réalisée par le chloroforme pur, puis des mélanges chloroforme-méthanol et méthanol-eau à différents gradients, enfin par de l'eau pure.

Les lots M17, M18 et M19 rassemblés car similaires, sont soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élution menée dans un mélange chloroforme-méthanol (de 98-2 à 50-50) a permis d'obtenir 16 lots (O1-O16).

Le traitement de la fraction O10 par chromatographie préparative en phase inverse dans un mélange MeOH-H_2O (60-40), suivi d'une filtration sur colonne de Sephadex dans le chloroforme a permis d'isoler le composé **D** à l'état pur.

3.2 Détermination de structures des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle

3.2.1 Composé A



Stigmast-4-en3-one

Le composé **A** se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le chloroforme. Son spectre de masse (Figure 3.2) réalisé en impact électronique (EI-MS) montre un pic d'ion moléculaire à m/z = 412 $[M]^{+\cdot}$, correspondant à une formule brute en **$C_{29}H_{48}O$**.

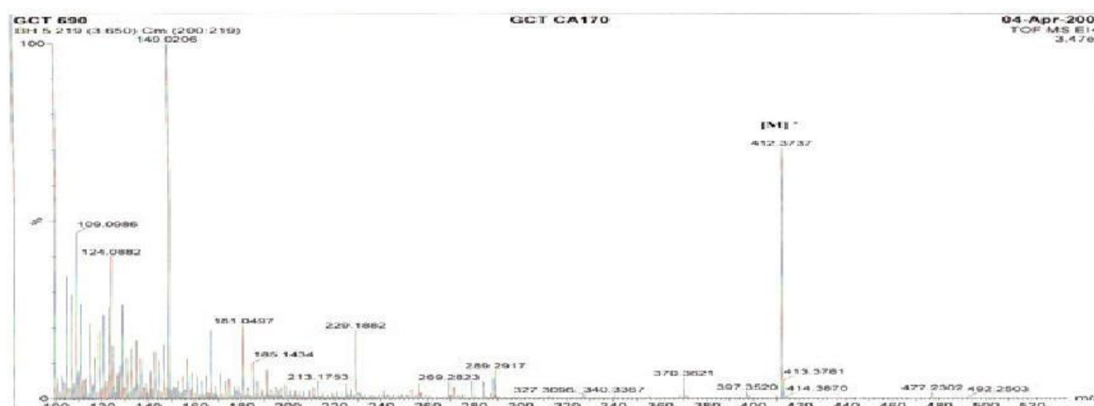


Figure 3.2: Spectre de masse (EI-MS) du composé A

Le spectre RMN ^1H (Figures 3.3 et 3.4), enregistré dans $CDCl_3$, présente à champ faible, un signal singulet d'intégration 1H à 5,77 ppm d'un proton oléfinique, et à champ fort, une série de six signaux d'intégration 3H chacun, allant de 0,76 à 1,23 ppm. Ces derniers, attribuables à six groupements méthyles, se répartissent en :

- ✓ Trois doublets résonant à δ_H 0,97 (*d, J* = 6,6 Hz, Me-21), 0,86 (*d, J* = 6,8 Hz, Me-27) et 0,89 (*d, J*= 6,6 Hz, Me-26).
- ✓ Un triplet résonant à δ_H 0,90 (*t, J* = 7,5 Hz, Me-29).
- ✓ Deux singulets résonant à δ_H 0,76 (Me-18) et 1,23 (Me-19).

L'ensemble de ces signaux, en plus de la formule brute déduite du spectre de masse, montre que le composé **A** appartient à la famille des stérols, de type sitostérol plus précisément.

Cependant, l'absence du signal de proton H-3, résonant habituellement vers 3,5 ppm implique que ce composé ne porte pas un groupement hydroxyle en C-3.

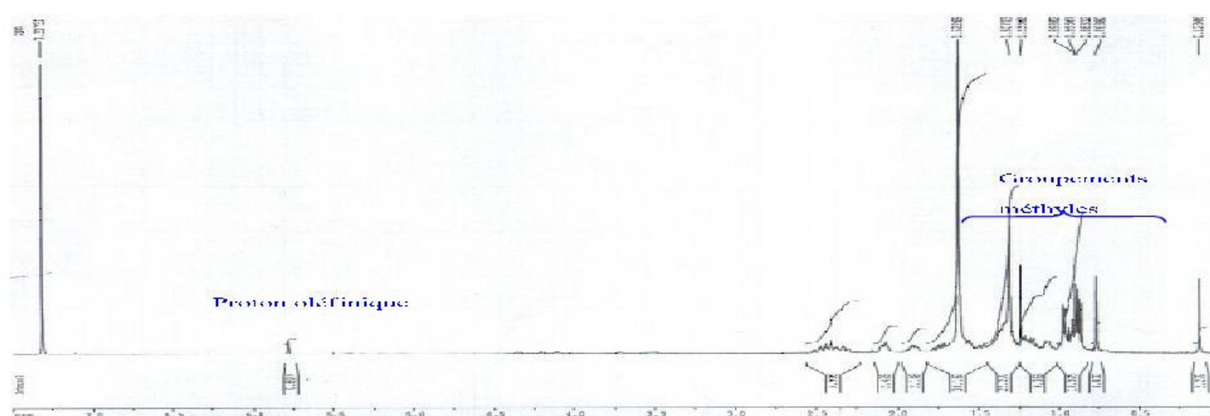


Figure 3.3: Spectre RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) du composé A

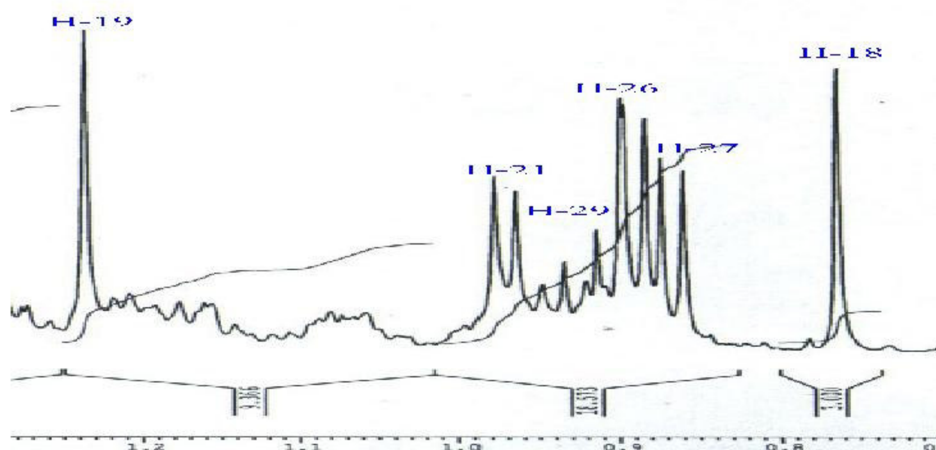
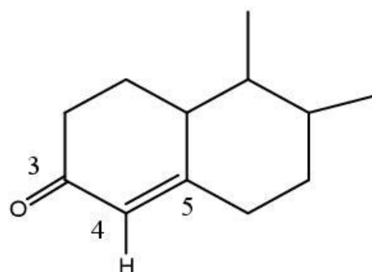


Figure 3.4 : Spectre RMN ^1H des méthyles du composé A

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure 3.5) qui permet de compter 29 signaux de carbone, confirme notre hypothèse quant à la nature stéroïdique de notre composé, et cela par l'observation de :

- ✓ six carbones de groupements méthyles sortant à δ_C 11,9 (C-18), 17,4 (C-19), 18,7 (C-21), 19,8 (C-26), 19,0 (C-27) et 12,0 (C-29).
- ✓ deux carbones oléfiniques, l'un méthine et l'autre quaternaire repérés à δ_C 123,7 et δ_C 171,8.

L'observation d'un signal sortant à 199,8 ppm, caractéristique d'un carbone de carbonyle, est attribuable au carbone C-3 du stéroïde. Ceci est conforté par l'absence du signal du proton H-3 observé sur le spectre RMN ^1H d'une part et le déblindage du carbone oléfinique sortant à δ_C 171,8 (C-5) d'autre part, suggérant la présence d'un système énone conjugué d'une stérone. Le signal de carbone oléfinique détecté à δ_C 123,7 est donc attribué au carbone C-4.



A noter que le signal du carbone C-3 observé habituellement vers 72 ppm dans le cas des stérols [67, 68], n'apparait pas sur le spectre RMN ^{13}C (Figure 3.5).

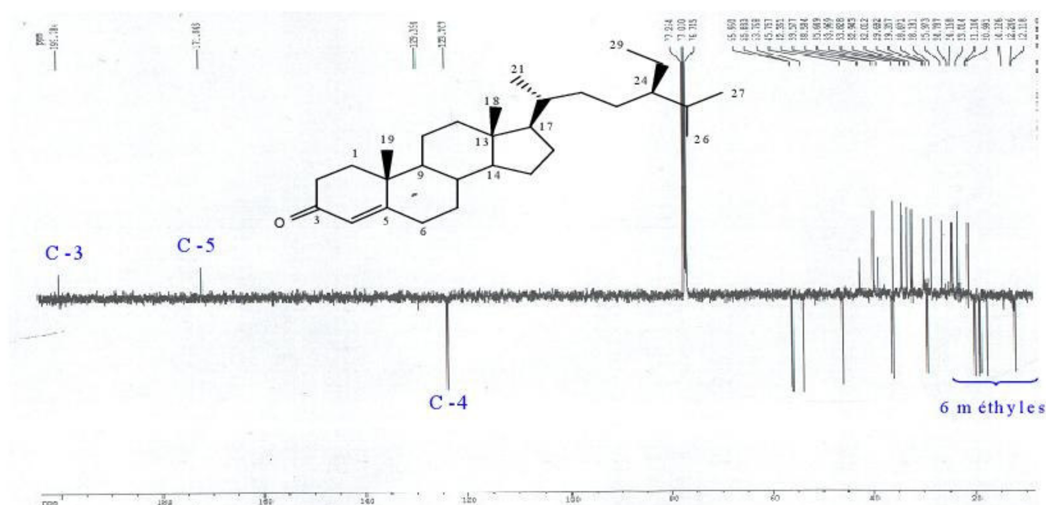
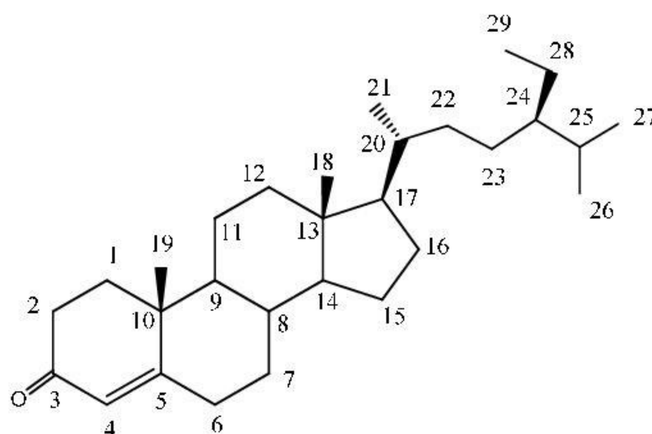


Figure 3.5: Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) du composé A

De plus, la comparaison des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C avec les données de la littérature [69, 70] indique clairement que notre composé est un sitostérol, métabolite largement répandu dans le règne végétal, possédant un carbonyle en C-3. Il s'agirait donc de la sitostérone qui n'est, contrairement au sitostérol, rencontré qu'au sein de certaines espèces.



L'expérience de corrélation homo-nucléaire COSY H-H (Figures 3.6 et 3.7) confirme cette hypothèses. En effet le spectre COSY H-H montre des couplages entre :

- ✓ Le proton H-4 (δ_H 5 ,77) et les protons géminés H-6 b (δ_H 2,33, *m*) et H-6 a (δ_H 2,43, *m*).

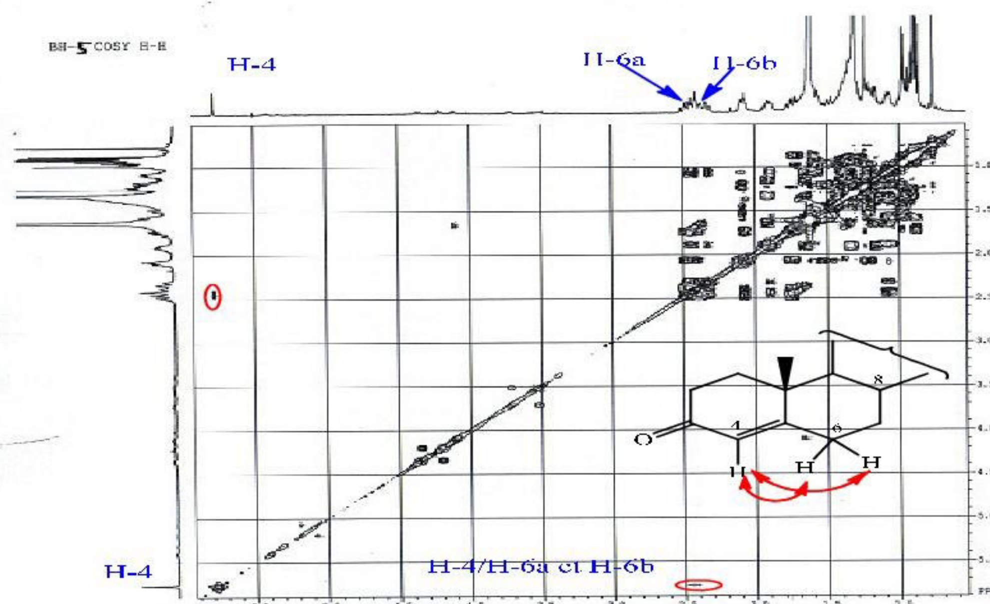


Figure 3.6: Spectre COSY H-H du composé A

- ✓ Ces derniers et les protons géminés H-7 (δ_H 1,89, H-7 a ; δ_H 1,07, H-7 b).
- ✓ Les protons géminés H-11 a et H-11 b (2H, δ_H [1,43-1,57], *m*) et les protons géminés H-12 a (δ_H 2,07, *m*) et H-12 b (δ_H 1,21, *m*).

- ✓ Le proton H-15 a (δ_H 1,61, *m*) et le proton H-16 a (δ_H 1,90, *m*).
- ✓ Le proton H-16 a et le proton H-17 (δ_H 1,16, *m*).
- ✓ Le proton H-20 (δ_H 1,42, *m*) et les protons du groupement méthyle H-21 (δ_H 0,97, *d*, *J* = 6,6 Hz).
- ✓ Le proton H-24 (δ_H 0,98, *m*) et le proton H-25 (δ_H 1,72, *m*).
- ✓ Le proton H-25 et les protons méthyliques H-26 (δ_H 0,89, *d*, *J* = 6.8 Hz).
- ✓ Le proton H-25 et les protons méthyliques H-27 (δ_H 0,86, *d*, *J* = 6.8 Hz).

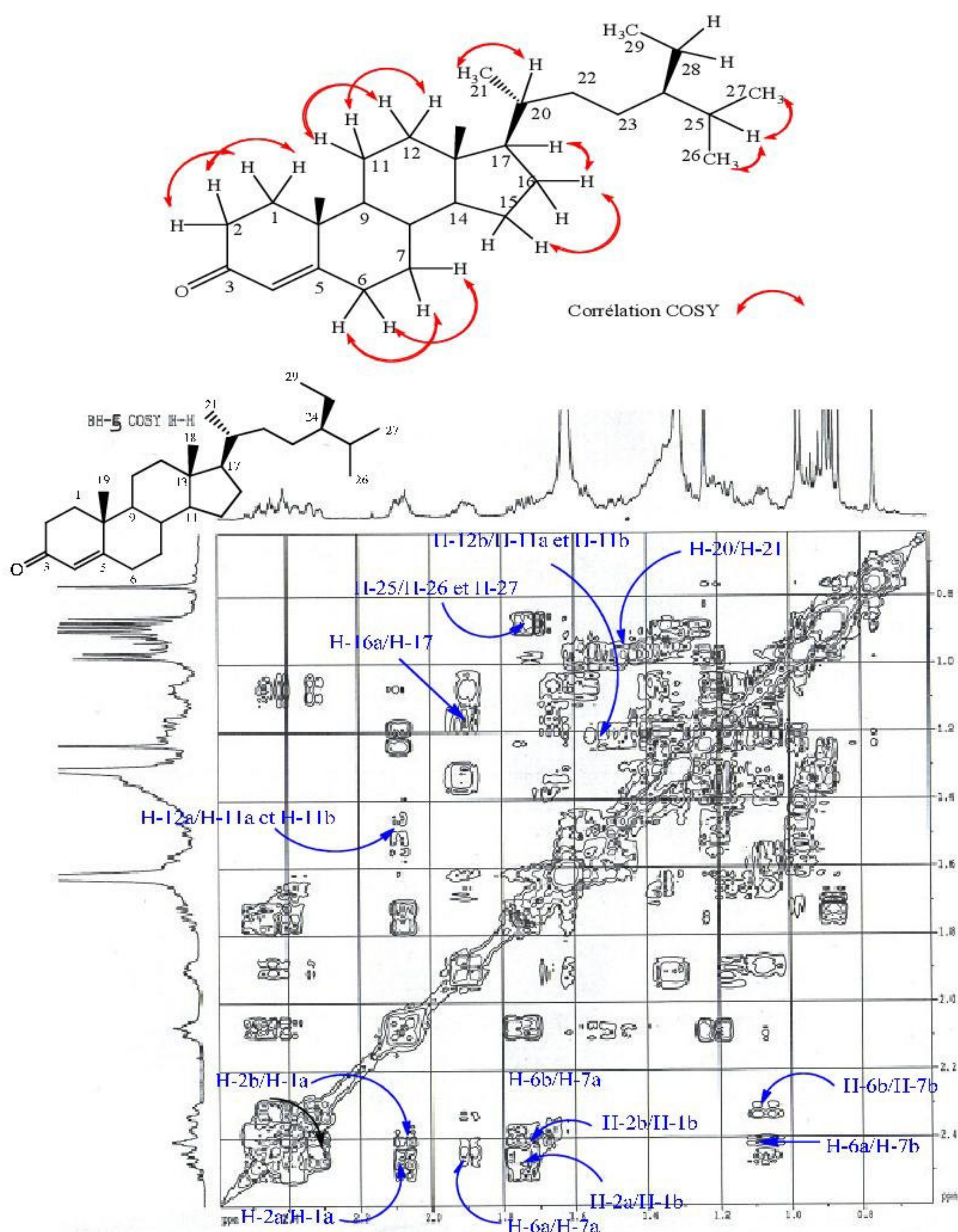


Figure 3.7 : Spectre COSY H-H du composé A

A partir des protons identifiés par expérience COSY H-H, l'expérience HSQC (Figure 3.8) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent à travers leurs couplages en $^{1}J_{C\text{-}H}$. Les différentes corrélations sont observées entre :

- ✓ Les protons géminés H-1a et H-1b et le carbone C-1 (δ_C 35,7).
- ✓ Les protons géminés H-2a et H-2b et le carbone C-2 (δ_C 34,0).
- ✓ Le proton oléfinique H-4 et le carbone C-4 (δ_C 123.7).
- ✓ Les protons géminés H-6a et H-6b et le carbone C-6 (δ_C 32,9).
- ✓ Les protons géminés H-7a et H-7b et le carbone C-7 (δ_C 32,0).
- ✓ Le proton H-8 et le carbone C-8 (δ_C 35,6).
- ✓ Le proton H-9 et le carbone C-9 (δ_C 53,8).
- ✓ Le proton H-14 et le carbone C-14 (δ_C 55,8).
- ✓ Le proton H-17 et le carbone C-17 (δ_C 55,9).
- ✓ Les protons du groupement méthylique H-19 et le carbone C-19 ($\delta_C = 17,4$).
- ✓ Les protons du groupement méthylique H-18 et le carbone C-18 ($\delta_C = 11,9$).
- ✓ Les protons du groupement méthylique H-21 et le carbone C-21 ($\delta_C = 18,7$).
- ✓ Les protons du groupement méthylique H-26 et le carbone C-26 ($\delta_C = 19,8$).
- ✓ Les protons du groupement méthylique H-27 et le carbone C-27 ($\delta_C = 19,0$).
- ✓ Les protons du groupement méthylique H-29 et le carbone C-29 ($\delta_C = 12,0$).

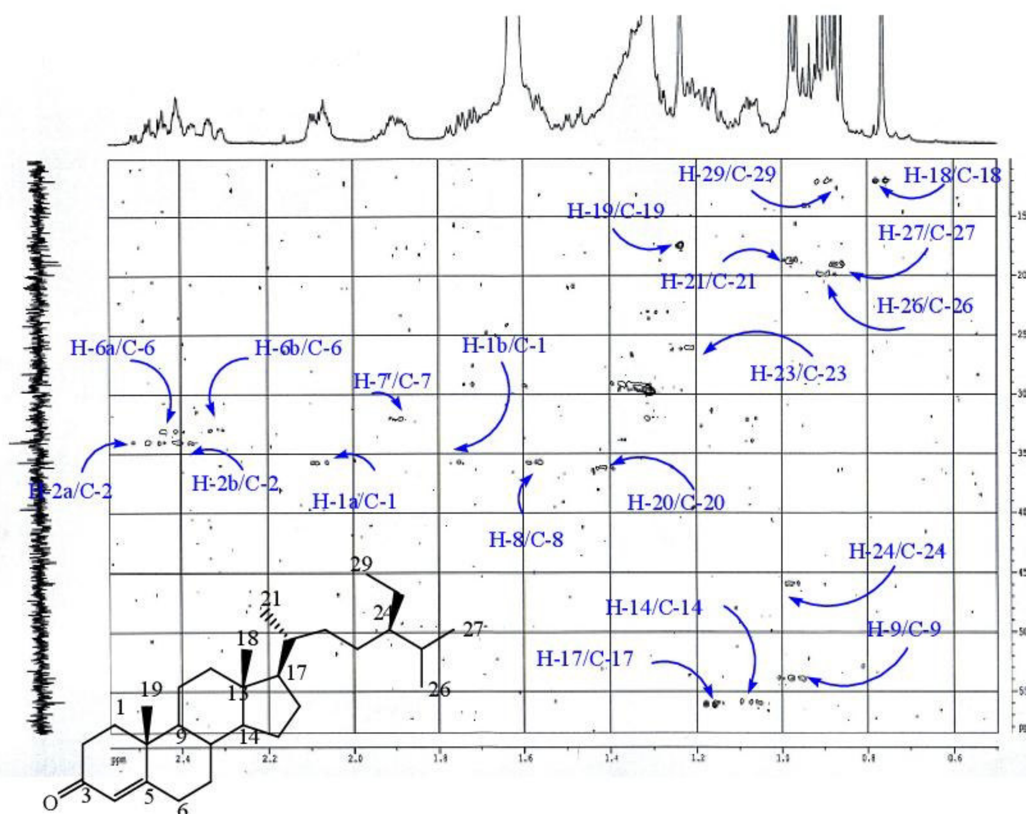


Figure 3.8 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé A

L'expérience HMBC (Figure 3.9) montre des corrélations en ^{2}J et ^{3}J entre :

- ✓ Les protons du groupement méthyle Me-19 et les carbones C-1 (δ_C 35,7), C-10 (δ_C 38,6), C-9 (δ_C 53,8) et le carbone oléfinique C-5 (δ_C 171,8).
- ✓ Les protons du groupement méthyle Me-18 et les carbones C-12 (δ_C 39,6), C-13(δ_C 42,4), C-14(δ_C 55.8) et C-17 (δ_C 55,9).
- ✓ Les protons du groupement méthyle Me-21 et les carbones C-20 (δ_C 36,0), C-22 (δ_C 33,8) et C-17 (δ_C 55,9).
- ✓ Les protons du groupement méthyles Me-26 et Me-27 et les carbones C-24 (δ_C 45,7) et C-25 (δ_C 29,1).
- ✓ Les protons du groupement méthyle Me-29 et les carbones C-28 (δ_C 23,0) et C-24 (δ_C 45,7).

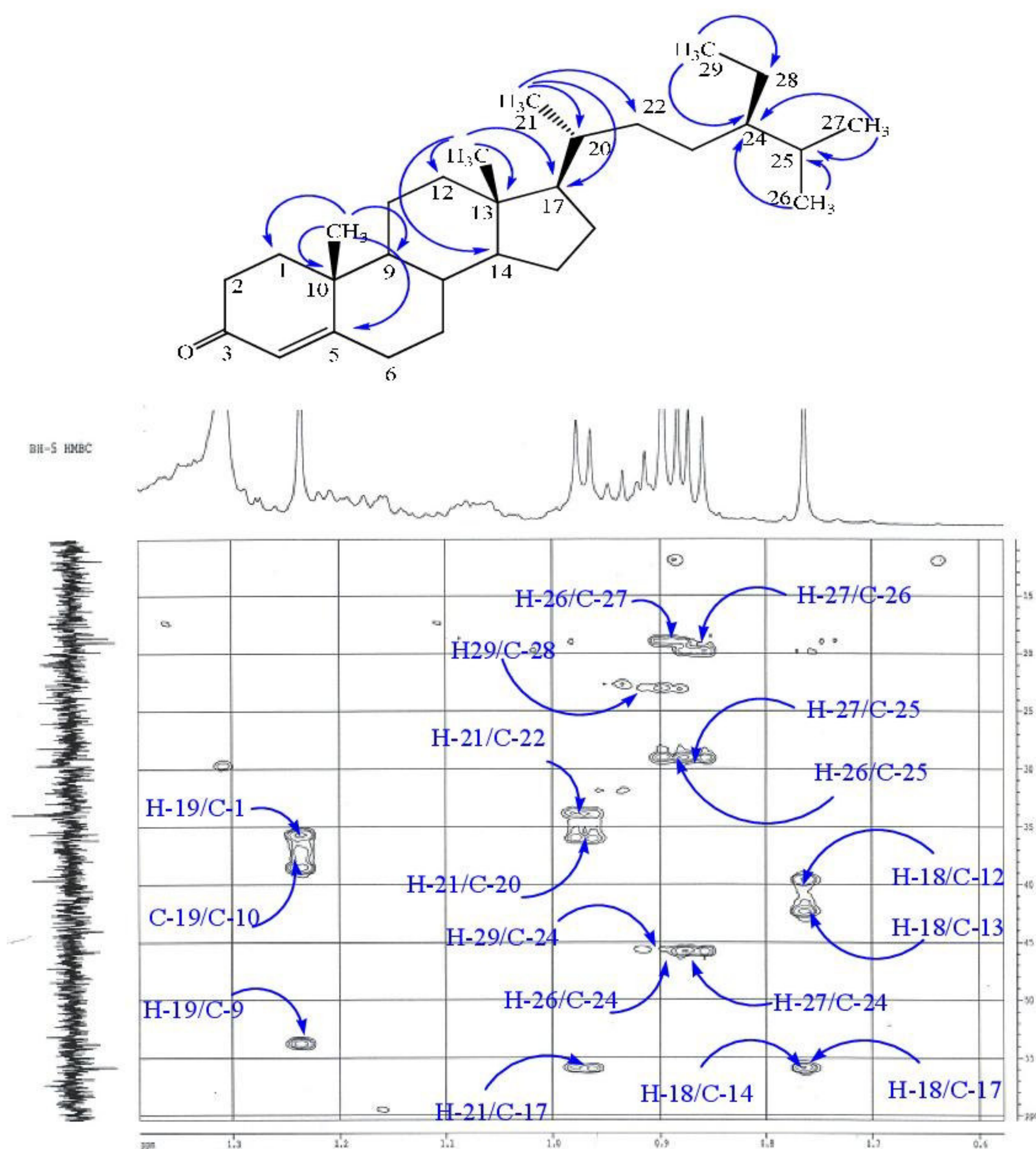


Figure 3.9 : Spectre HMBC du composé A

A l'issue de cette analyse, tous les protons et carbones du composé A sont identifiés (Tableau 3.1).

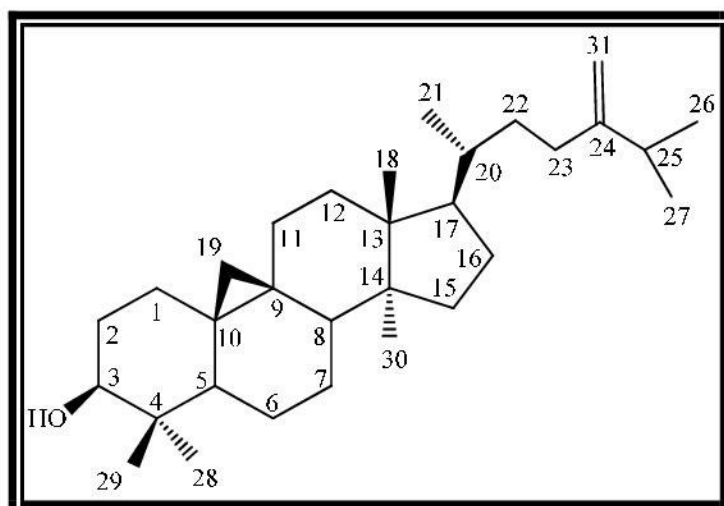
N°	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm)**	***J* (Hz)**
1 (CH_2)	35,7	1,75 *ddd* (H-1 b) 2,05 *m* (H-1 a)	15,9 – 13,.5 – 4,8 -
2 (CH_2)	34,0	2,41 *m* (H-2 b) 2,49 *m* (H-2 a)	- -
3 (C)	199,8	-	-
4 (CH)	123,7	5,77 *s*	-
5 (C)	171,8	-	-
6 (CH_2)	32,9	2,33 *m* (H-6 b) 2,43 *m* (H-6 a)	- -
7(CH_2)	32.0	1,07 *m* (H-7 b) 1,89 *m* (H-7 a)	- -
8 (CH)	35,6	1,57 m	-
9 (CH)	53,8	0,96 *m*	-
10 (C)	38,6	-	-
11 (CH_2)	21,0	[1,43-1,57] 2H *m*	-
12 (CH_2)	39,6	2,07 *m* (H-12 a) 1,21 *m* (H-12 b)	- -
13 (C)	42,4	-	-
14 (CH)	55,8	1,08 *m*	-

15 (CH_2)	24,2	1,61 *m* (H-15 a) 1,07 *m* (H-15 b)	- -
16 (CH_2)	28,2	1,90 *m* (H-16 a) 1,33 *m* (H-16 b)	- -
17 (CH)	55,9	1,16 *m*	-
18 (CH_3)	11,9	0,6 *s*	-
19 (CH_3)	17,4	1,23 *s*	-
20 (CH)	36,0	1,42 *m*	-
21 (CH_3)	18,7	0,97 *d*	6,6
22 (CH_2)	33,8	1,07 *m* (H-22 b) 1,37 *m* (H-22 a)	- -
23 (CH_2)	26,0	[1,21-1,26] 2H *m*	-
24 (CH)	45,7	0,98 *m*	-
25 (CH)	29,1	1,72 *m*	-
26 (CH_3)	19,8	0,89 *d*	6,8
27 (CH_3)	19,0	0,86 *d*	6,8
28 (CH_2)	23,0	[1,19-1,28] 2H *m*	-
29 (CH_3)	12,0	0,90 *t*	7.5

Tableau 3.1 : Données RMN ^1H et RMN ^{13}C (500 MHz) dans $CDCl_3$ du composé A

L'ensemble des données spectroscopiques, appuyées par celles de la littérature [69,70] ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +55$ (C = 0,22 g/ 100ml, $CHCl_3$) permet d'identifier sans équivoque ce composé à la sitostérone : **Stigmast-4-en-3-one.** Ce composé est isolé pour la première fois de la famille Resedaceae.

3.2.2 Composé B



24-méthylènecycloartane-3*β*-ol

Le composé **B** obtenu également sous forme de poudre blanche, présente une formule brute en $\mathbf{C_{31}H_{52}O}$. La formule est déduite par le spectre de masse (EI-MS) qui montre un pic d'ion moléculaire à m/z = 440 $[M]^{+\cdot}$ (Figure 3.10).

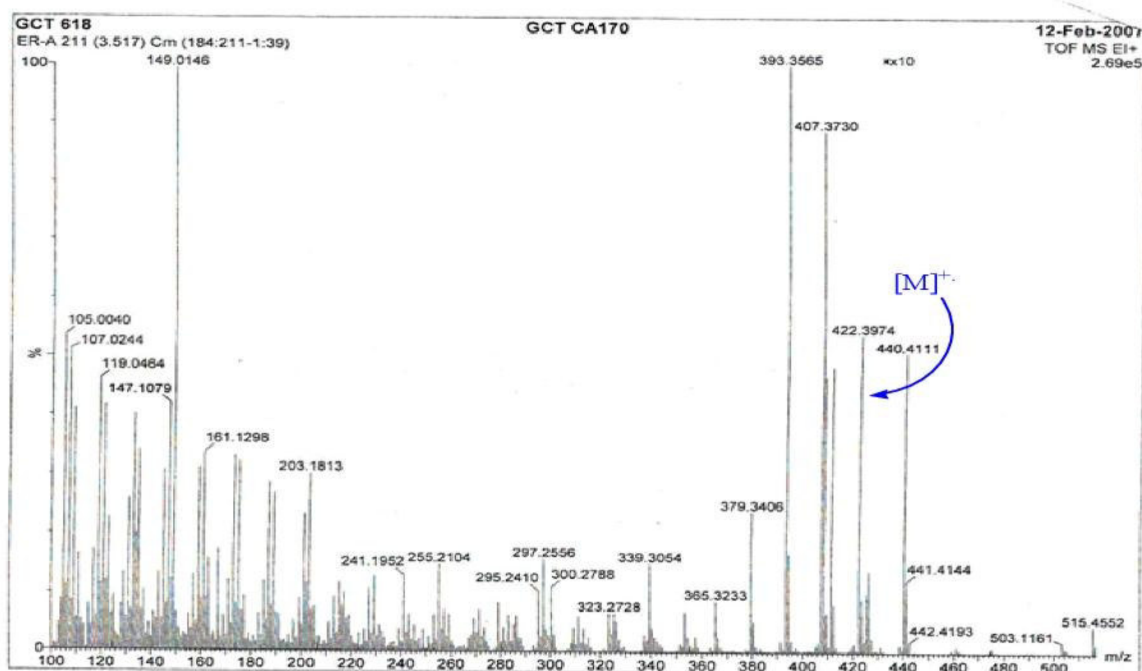


Figure 3.10 : Spectre de masse EI-MS du composé B

Le spectre RMN ^{1}H (Figure 3.11) de ce composé, enregistré dans le chloroforme deutéré, montre :

- ✓ sept signaux à champ fort résonant à δ_H 0,86 (3H, *s*, H-29), 0,94 (3H, *s*, H-30), 0,95 (3H, *s*, H-21), 1,02 (3H, *s*, H-28), 1,02 (3H, *s*, H-18), 1,07 (3H, *d*, *J* = 6,8 Hz, H-26) et

1,09 (3H, *d*, *J* = 6,8 Hz, H-27), attestant la présence de sept groupements méthyles.

- ✓ deux signaux fortement blindés résonant sous forme de doublet à δ_H 0,38 (1H, *d*, J = 4,1 Hz, H-19 *exo*), 0,60 (1H, *d*, J = 4,0 Hz, H-19 *endo*) très caractéristiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane [71, 72].
- ✓ un signal sous forme doublet dédoublé à δ_H 3,35 (1 H, *dd*, *J* = 11,1; 4,3 Hz) d'un proton porté par un carbone oxyméthine (H-3).

Ces éléments cités montrent clairement que le composé est de nature triterpénique à squelette cycloartane. Ce squelette est présent dans beaucoup de genre comme *Astragalus* de la famille Fabaceae [73, 74].

Il est également observé, à champ fort, deux signaux résonant à δ_H 4.71 (1H, *s*, H-31b) et δ_H 4.77 (1H, *sl*, H-31 a) de deux protons oléfiniques.

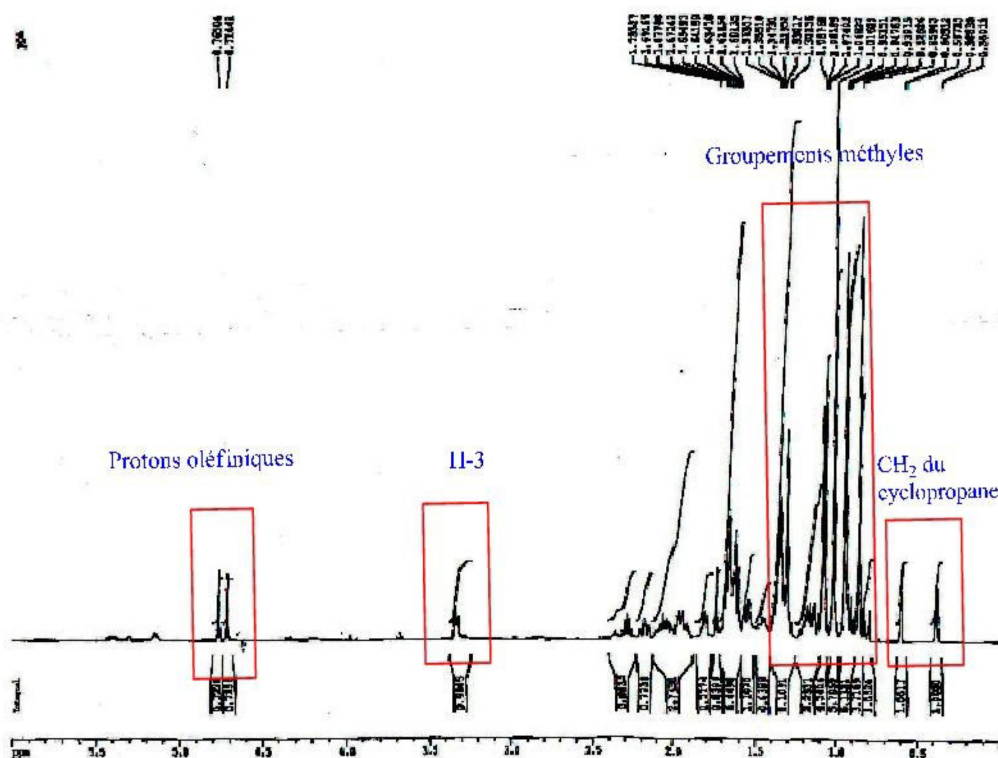


Figure 3.11: Spectre RMN ^{1}H du composé B

Le spectre RMN^{13}C DEPT (Figure 3.12) montre les signaux correspondant à sept méthyles, douze groupements méthylènes, six méthines dont un oxyméthine (δ_C 78,8, C-3) et six atomes de carbone quaternaire dont un oléfinique (δ_C 156,9, C-24), confirmant la nature triterpénique de ce composé.

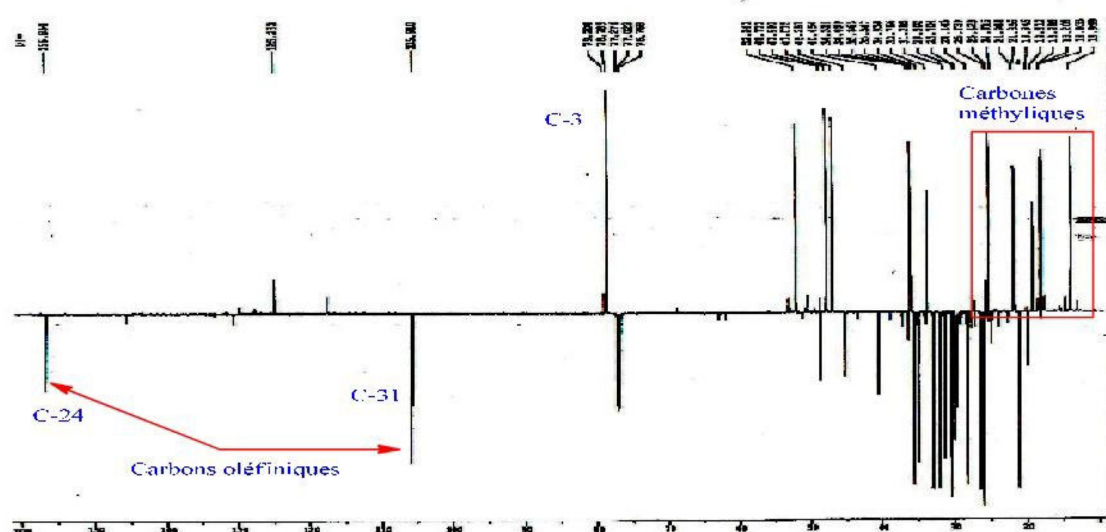


Figure 3.12 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé B

A partir des protons méthyliques cités précédemment, l'expérience héteronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure 3.13). Ces derniers sont repérés à δ_C 14,0 (C-29), 18,0 (C-18), 18,3 (C-21), 19,3 (C-30), 21,9 (C-26), 22,0 (C-27) et 25,4 (C-28). Elle permet également, à partir des protons cyclopropaniques H_2-19, d'identifier le carbone C-19 (δ_C 29,9) qui le porte.

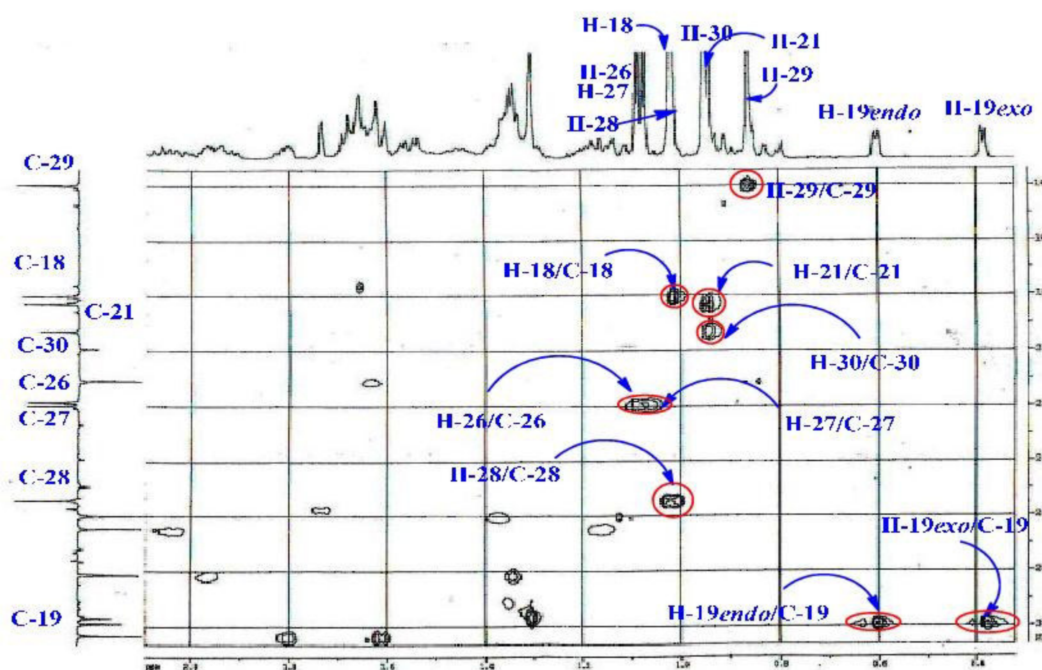


Figure 3.13 : Spectre HSQC ($CDCl_3$) du composé B

La même expérience confirme l'attribution des signaux des carbones C-3 (δ_C 78,8) et C-31 (δ_C 105,9) faite précédemment (Figure 3.14).

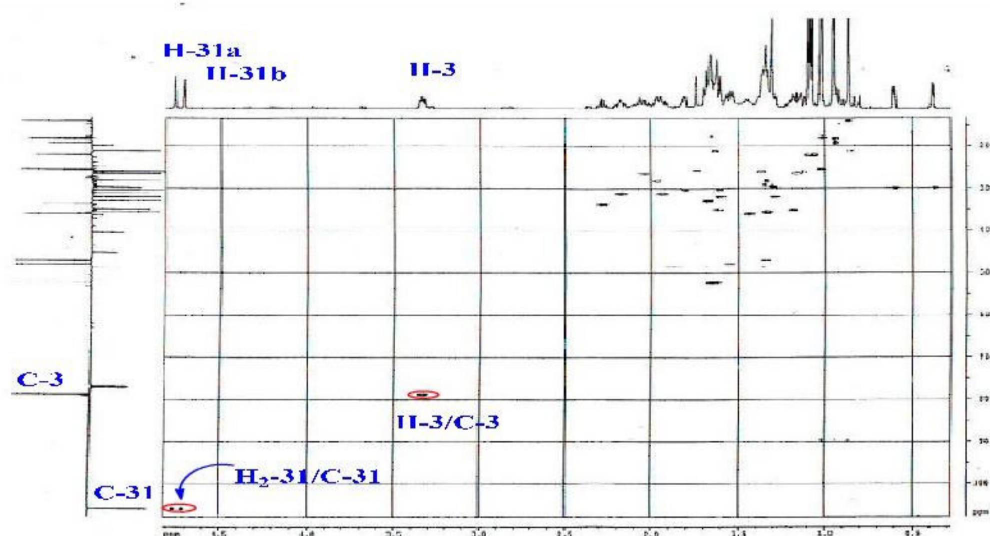


Figure 3.14: Spectre HSQC ($CDCl_3$) du composé B

L'expérience HMBC (Figures 3.15, 3.16, 3.17 et 3.18) et particulièrement dans le cas de triterpènes, constitue l'outil idéal en matière d'élucidation structurale car permettant de caractériser un grand nombre de carbones par observation de leurs couplages en ^2J et ^3J avec les protons méthyliques, car chacun corrélant au maximum avec quatre atomes de carbone. Ainsi :

- ✓ les méthyles 28 et 29 géminés résonant respectivement à 1,02 et 0,86 ppm corrèlent avec le carbone C-3 préalablement identifié (δ_C 78,8), le carbone quaternaire C-4 (δ_C 40,5) et le carbone C-5 ((δ_C 47,1) (Figure 3.15).

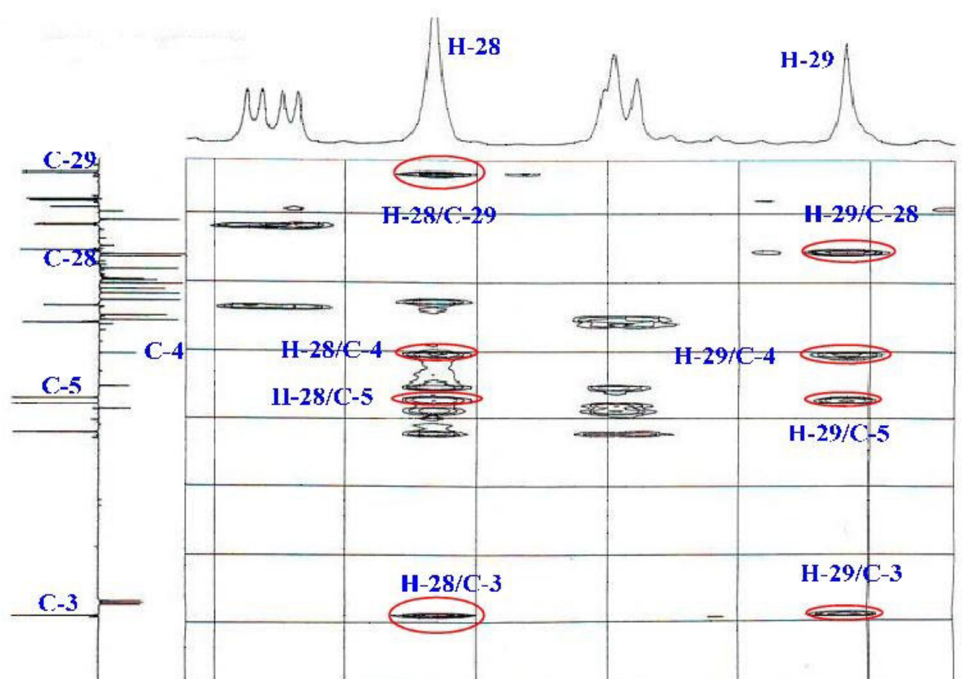


Figure 3.15: Spectre HMBC ($CDCl_3$) du composé B

Le proton H-5 résonant à 1,35 ppm, identifié par expérience HSQC, montre sur la carte HMBC cinq taches de corrélation avec les carbones C-4 (δ_C 40,5) et C-3 (δ_C 78,8) déjà identifiés, un carbone quaternaire (δ_C 26,0) ne pouvant être que C-10, le carbone méthylique C-29 et un carbone secondaire attribué à C-6 (δ_C 21,1) (Figure 3.16). Ce dernier a été également identifié par HSQC du fait de sa corrélation directe avec les deux protons H-6 repérés à 1,63 et 0,84 ppm, eux-mêmes déterminés par expérience COSY H-H du fait du couplage vicinal H-5 (δ_H 1,35)/H-6.

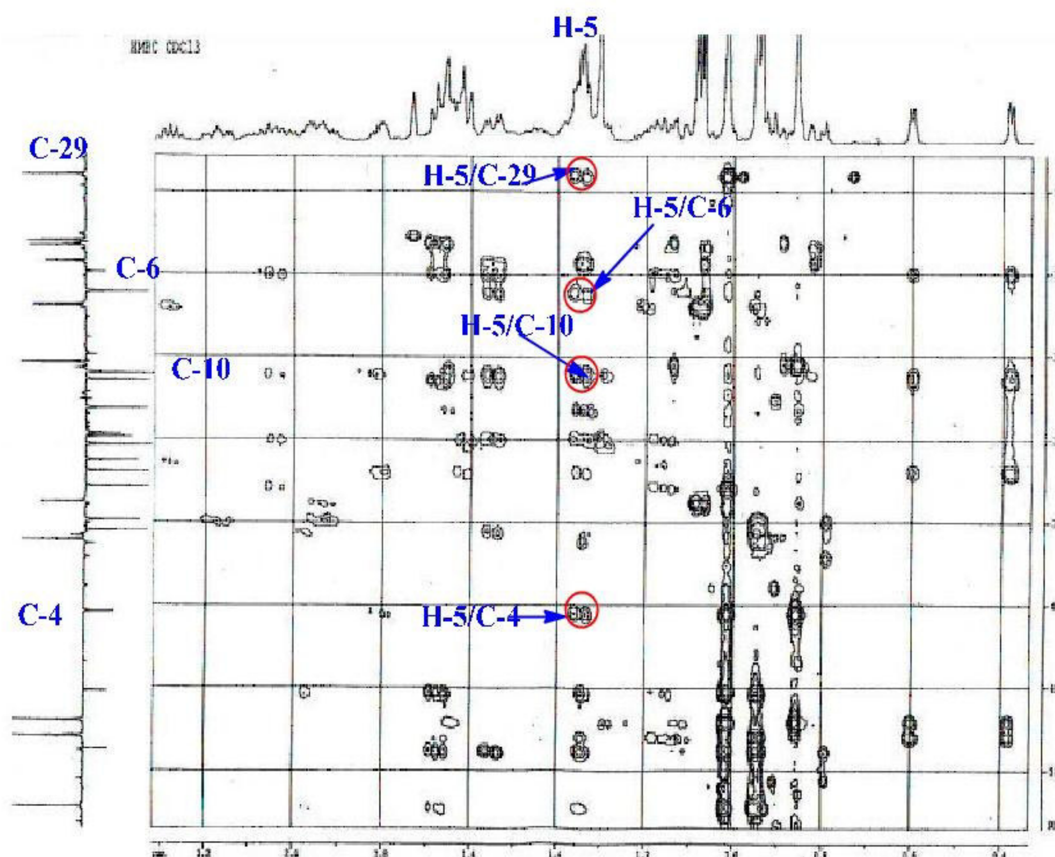


Figure 3.16: Spectre HMBC du composé B

Les protons méthyliques CH_3-30 (δ_H 0,94) sont préalablement caractérisés sur la base de leur corrélation CH longue distance avec le carbone C-8 (δ_C 48,0), lui-même identifié du fait également de son couplage $^3J_{C\text{-}H}$ avec les protons H-19 du système cyclopropanique (δ_H 0,60; 0,38). L'analyse HMBC montre les autres corrélations de ces protons méthyliques CH_3-30 avec le carbone secondaire C-15 (δ_C 35,5) et les deux carbones quaternaires C-13 (δ_C 45,3) et C-14 (δ_C 48,8) (Figure 3.17).

Les protons méthyliques CH_3-18 (δ_H 1,02) corrèlent en plus des carbones C-13 et C-14 identifiés, avec le carbone primaire C-17 (δ_C 52,2) et le carbone secondaire C-12 (δ_C 32,9) (Figure 3.17).

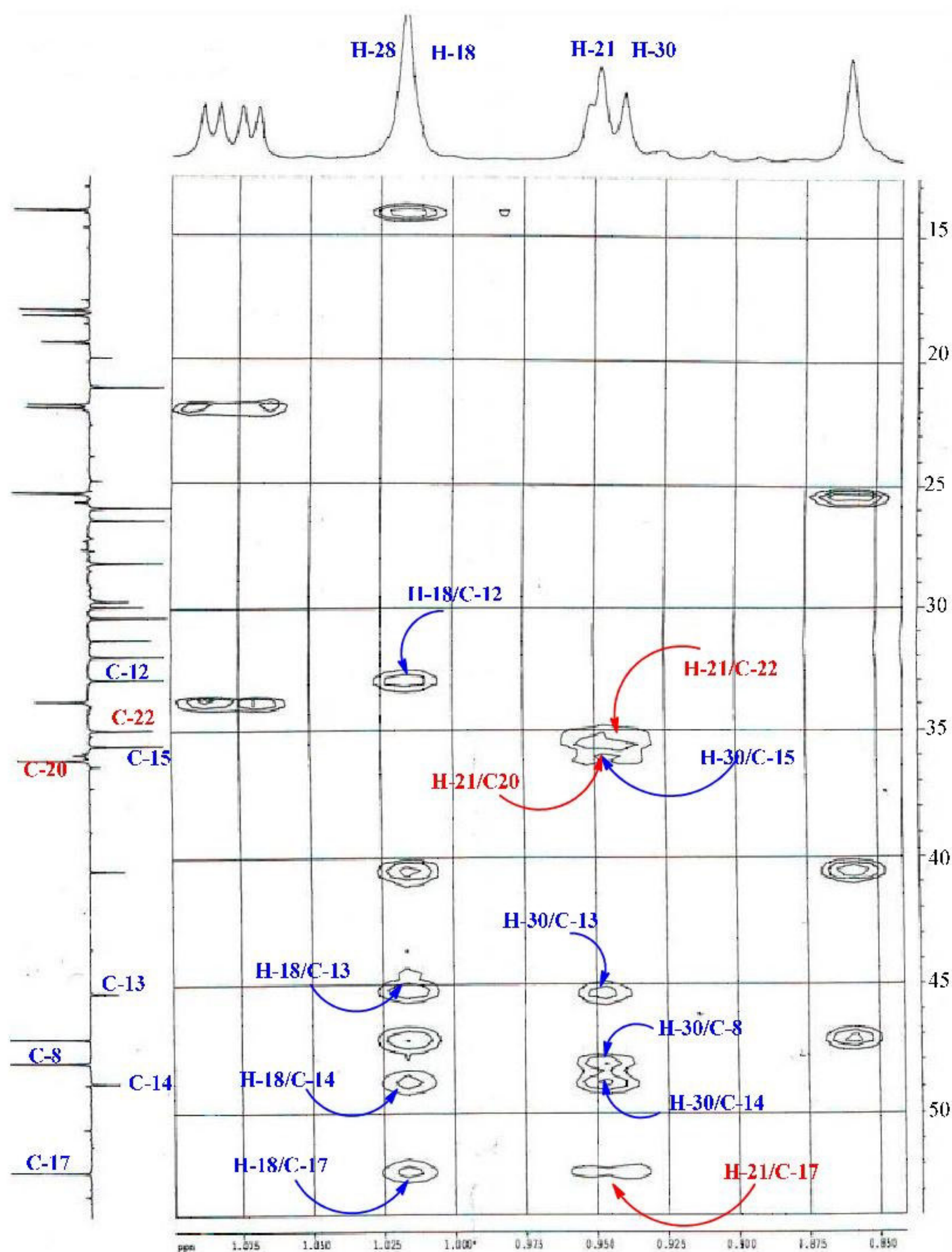


Figure 3.17: Spectre HMBC du composé B

Comme on le voit, le spectre HMBC a permis de caractériser la quasi-totalité des carbones du noyau cycloartane, du fait des corrélations observées à partir des méthyles angulaires. Les corrélations observées entre les protons cyclopropaniques H_2-19 et le carbone secondaire C-11 (δ_C 26,4) d'une part, et entre le proton H-3 (δ_H 3,35) et le carbone C-1 (δ_C 31,9) d'autre part, complètent pour une grande partie la caractérisation des carbones constituant le squelette cycloartane (Figure 3.18).

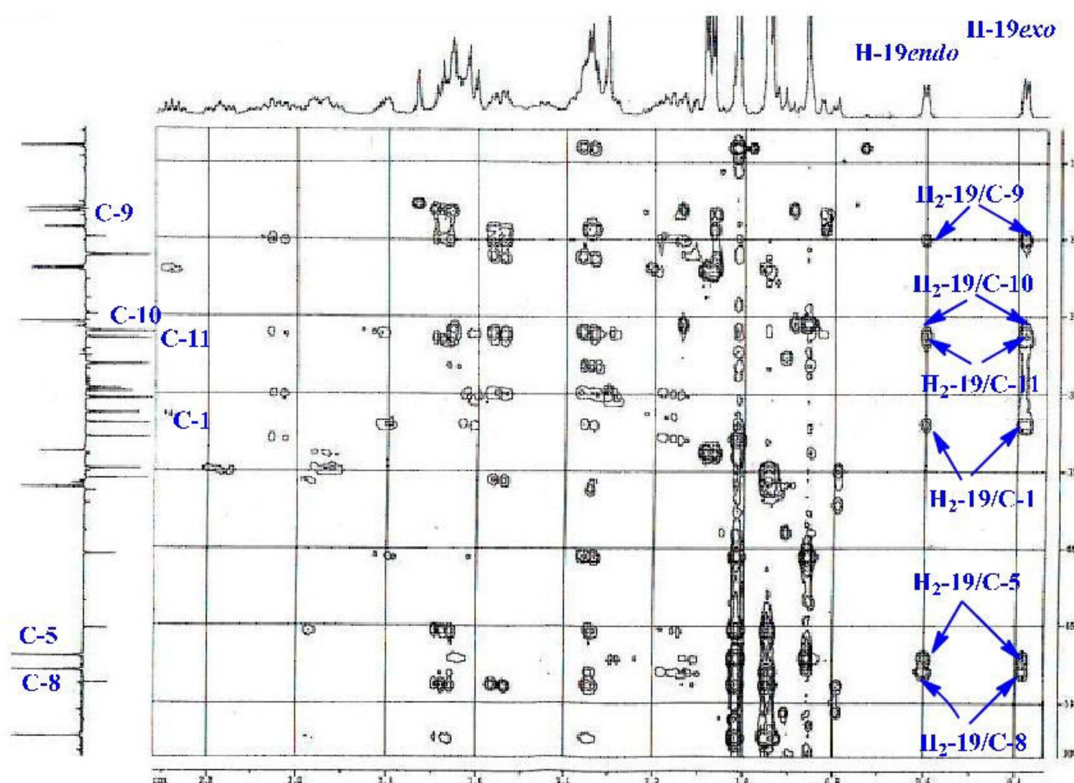


Figure 3.18: Spectre HMBC du composé B

La figure 3.19 ci-dessous reproduit les corrélations HMBC observées notamment à partir des méthyles CH_3-18, CH_3-28, CH_3-29 et CH_3-30.

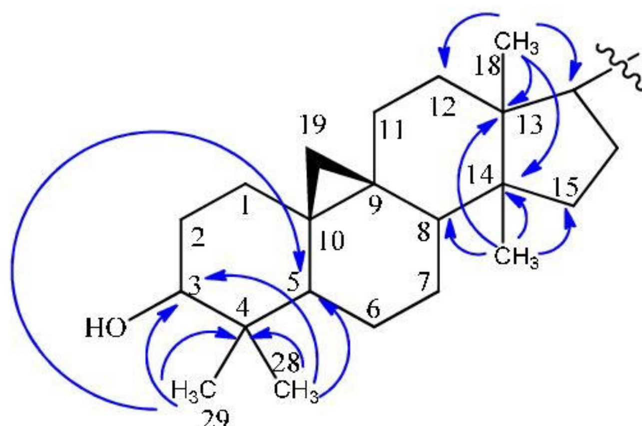


Figure 3.19: Corrélations HMBC des protons Me-18, Me-28, Me-29 et Me-30

Il reste maintenant à élucider la nature des substituants et leur position au sein du noyau cycloartane.

Le spectre COSY H-H (Figure 3.20) montre clairement une corrélation entre les protons H-15 (δ_H 1,35 ; 2H ; *m*) identifiés par expérience HSQC et les protons H-16 a

(δ_H 1,97) et H-16 b (δ_H 1,34), Ils corrèlent avec le carbone C-16 (δ_C 28,1) dans l'expérience HSQC.

En outre, le spectre COSY H-H met en évidence la présence d'un système de spins à travers les corrélations H-16 a, H-16 b et H-17 (δ_H 1,63), H-17 et un proton nommé H-20 (1H, *m*) repéré à 1,42 ppm, H-20 et les protons méthyliques CH_3-21 (δ_H 0,95), H-20 et deux protons géminés H-22 a (δ_H 1,62) et H-22 b (δ_H 1,19), les protons H-22 et deux protons géminés H-23 a (δ_H 2,18 ; *ddd ; J* = 15,5 ; 10,8 ; 4,7 Hz) et H-23 b (δ_H 1,94 ; *m*). Ce système de spins substitue le noyau cycloartane en C-17 (δ_C 52,2). Ceci est confirmé par l'expérience HMBC qui montre une corrélation entre les protons méthyliques H-21 et C-17.

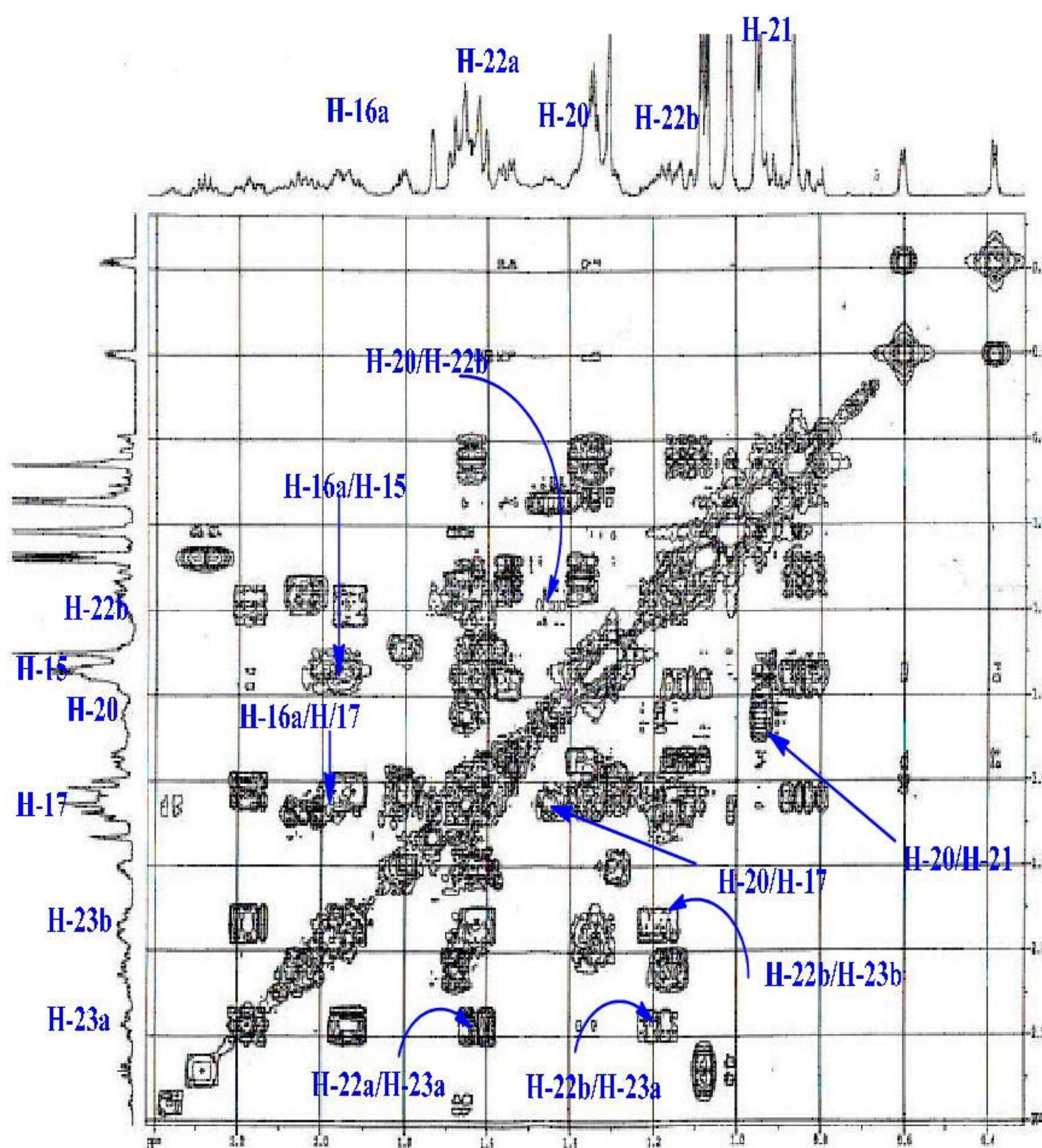


Figure 3.20: Spectre COSY H-H du composé B

Par ailleurs, le spectre COSY H-H (Figure 3.21) montre une corrélation entre les protons oléfiniques H-31 a (δ_H 4,77, *sl*) et H-31 b (δ_H 4,71, *sl*) attestant de la présence d'un groupement méthylène exocyclique.

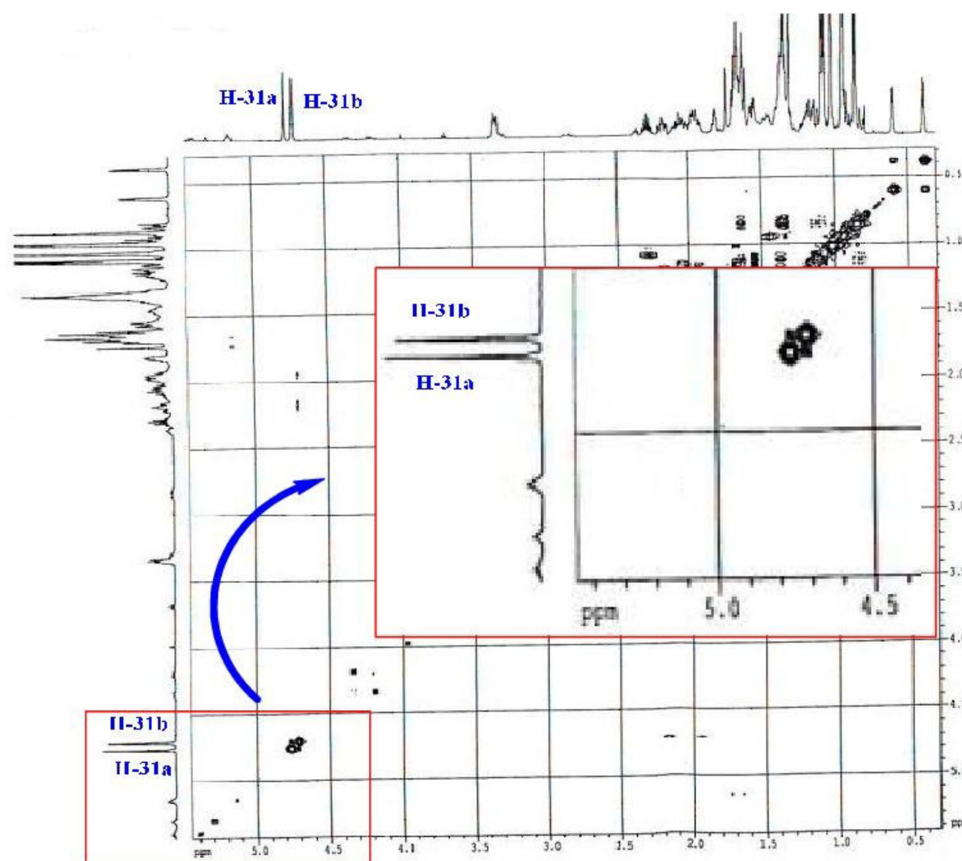
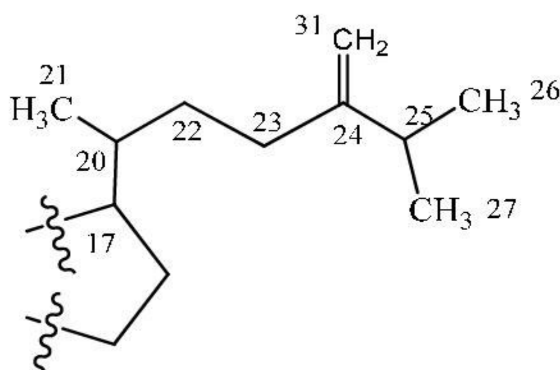


Figure 3.21: Spectre COSY H-H du composé B

Partant de ces derniers, l'expérience HMBC (Figures 3.22 et 3.23) montre des corrélations longue distance avec les carbones C-23 (δ_C 31,1), C-24 (δ_C 156,9) et C-25 (δ_C 33,8). Elle montre également d'autres couplages entre les protons méthyliques H-26/H-27 et C-24/C-25. Toutes ces données permettent d'identifier la structure du substituant en C-17.



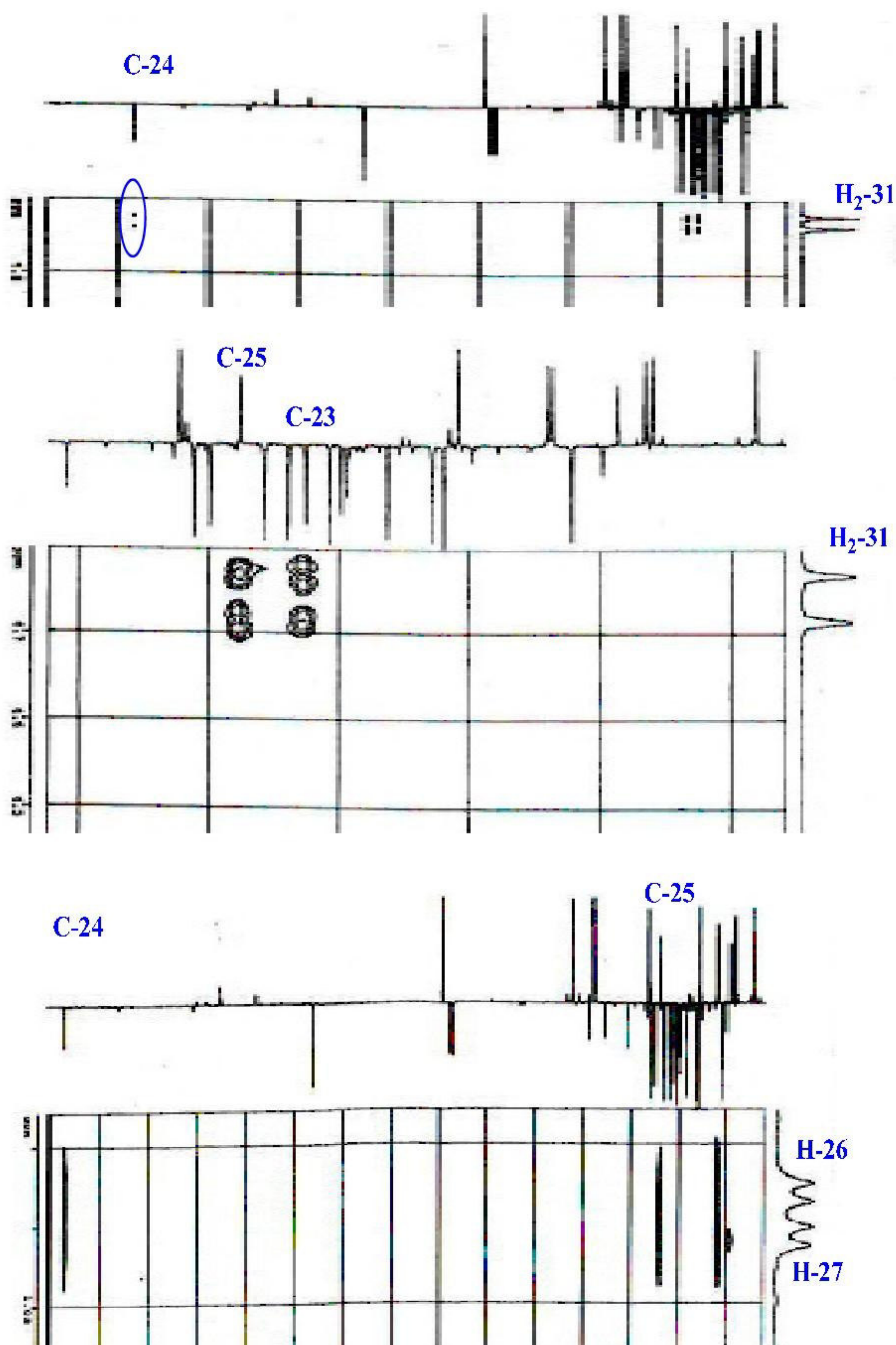


Figure 3.22: Spectre HMBC du composé B

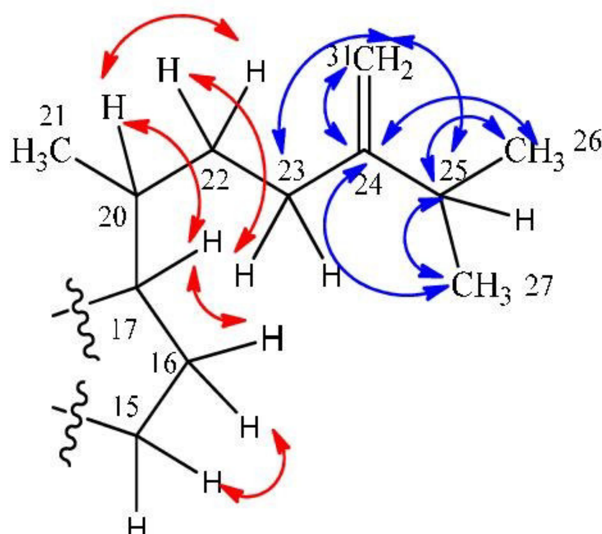


Figure 3.23: Corrélation COSY H-H et HMBC de la chaîne latérale du composé B

L'expérience NOESY s'est avérée judicieuse pour assigner la stéréochimie du composé, particulièrement au niveau de la chaîne latérale (figures 3.24, 3.25 et 3.26). Il faut signaler d'abord la position β du groupement méthylène CH_2-19 qui concerne tous les composés à squelette 9,19-cyclotriterpénoïde [75]. L'effet NOE observé sur le spectre NOESY, enregistré dans $CDCl_3$, entre le proton H-19 *endo* (δ_H 0,60) et les protons méthyliques Me-29, confirme l'orientation β-axiale de ces groupements. L'absence de corrélation H-19/H-5 montre que le proton H-5 est α orienté. Des effets NOE sont également visualisés entre les protons H-19 *endo* et H-8 β ainsi qu'entre les protons méthyliques H-30 α et le proton H-17. On observe également les corrélations Me-18 β/H-20 et Me-21 α/H-17 α. Par ailleurs, la constante de couplage du proton H-3 (*J* = 11,1, 4,3 Hz) et l'effet NOE H-3/H-5 α indique que ce proton est α- orienté.

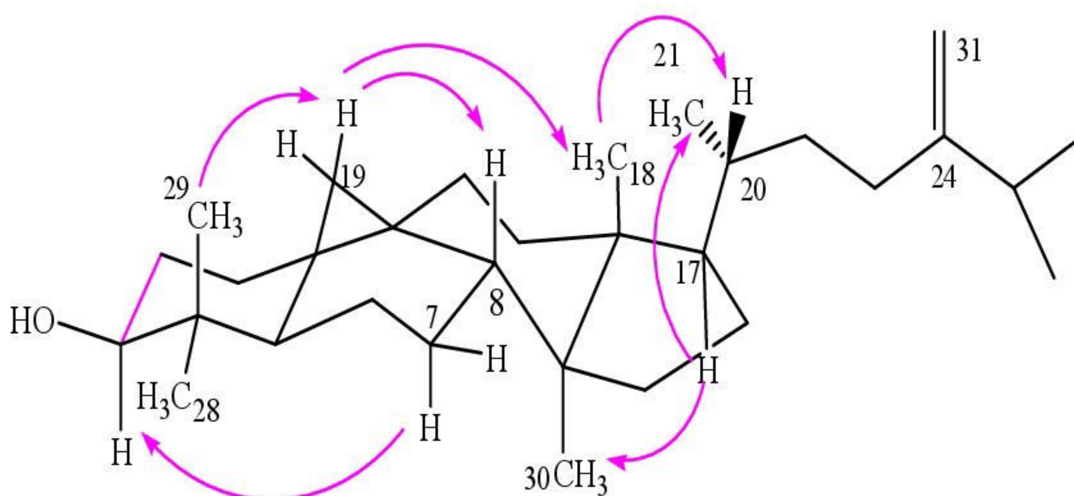


Figure 3.24: Principales corrélations NOE ($CDCl_3$) observées pour le composé B

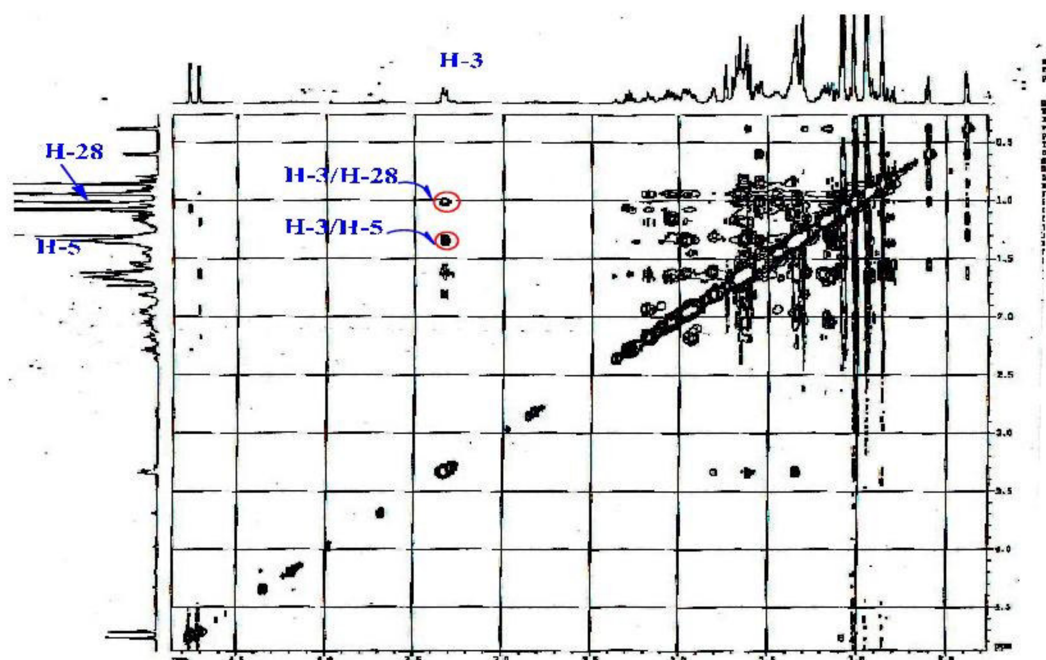


Figure 3.25: Spectre NOESY ($CDCl_3$)du composé B

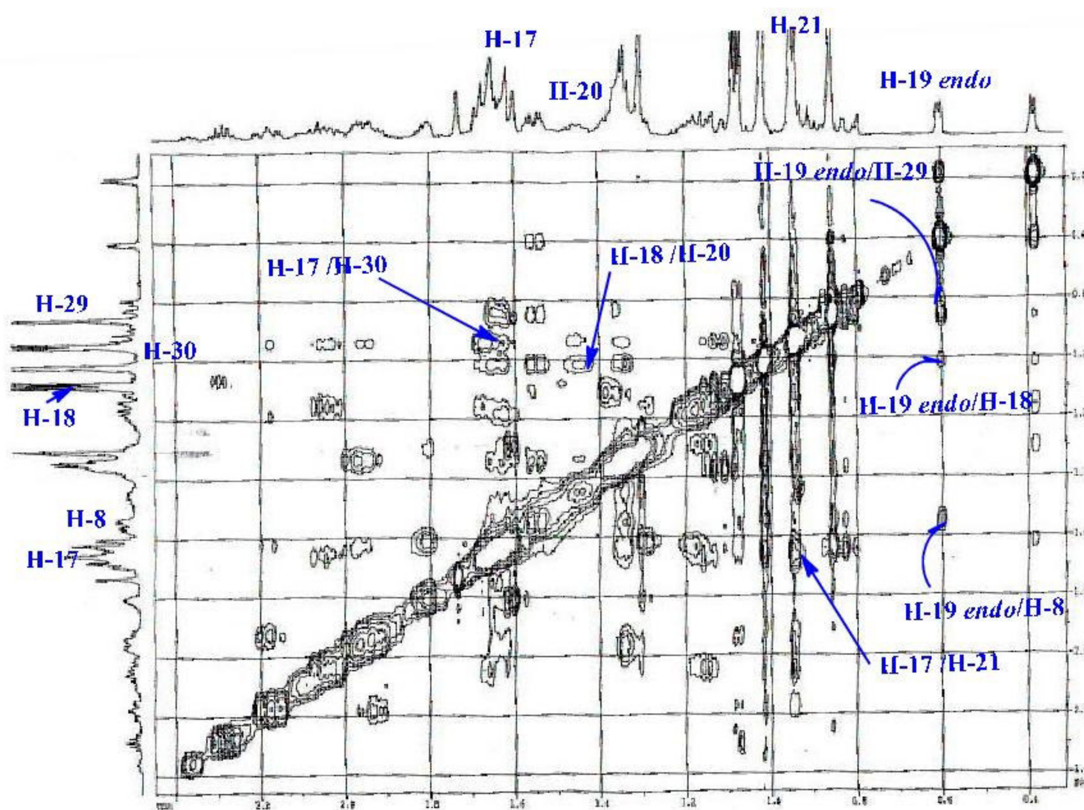


Figure 3.26: Spectre NOESY ($CDCl_3$)du composé B

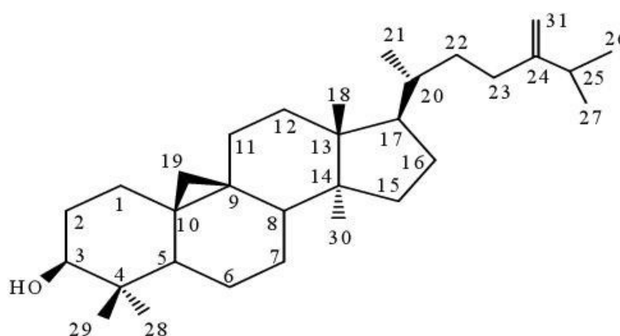
L'analyse combinée des spectres RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY, permet d'attribuer sans ambiguïté les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **B** (Tableau 3.2).

Position N°	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	*J* (Hz)
1 (CH_2)	31,9	1,29 *m* (H-1 b) 1,62 *m* (H-1 a)	- -
2 (CH_2)	30,3	1,62 *m* (H-2 b) 1,80 *m* (H-2 a)	- -
3 (CH)	78,8	3,35 *dd*	11,1 – 4,3
4 (C)	40,5	-	-
5 (CH)	47,1	1,35 *m*	-
6 (CH_2)	21,1	0,84 *m* (H-6 b) 1,63 *m* (H-6 a)	- -
7 (CH_2)	26,0	1,12 *m* (H-7 b) 1,38 *m* (H-7 a)	- -
8 (CH)	48,0	1,55 *dd*	12,3 – 4,7
9 (C)	19,9	-	-
10 (C)	26,0	-	-
11 (CH_2)	26,4	1,18 *m* (H-11 b) 2,04 *m* (H-11 a)	- -
12 (CH_2)	32,9	1,67 *m* 2H	-
13 (C)	45,3	-	-
14 (C)	48,8	-	-
15 (CH_2)	35,5	1,35 *m* 2H	-
16 (CH_2)	28,1	1,34 *m* (H-16 b) 1,97 *m* (H-16 a)	- -
17 (CH)	52,2	1,63 *m*	-
18 (CH_3)	18,0	1,02 *sl*	-
19 (CH_2)	29,9	0.38 *d* (H-19 *exo*) 0.60 *d* (H-19 *end*)	4,1 4,1
20 (CH)	36,1	1,45 *m*	-
21 (CH_3)	18,3	0,95 *sl*	-
22 (CH_2)	34,9	1,19 *m* (H-22 b) 1,62 *m* (H-22 a)	- -
23 (CH_2)	31,3	1,94 *m* (H-23 b) 2,18 ddd (H-23 a)	- 15,5 – 10,8 – 4,7
24 (C)	156,9	-	-
25 (CH)	33,8	2.28 *sept*	6,8
26 (CH_3)	21,9	1,07 *d*	6,8
27 (CH_3)	22,0	1,09 *d*	6,8

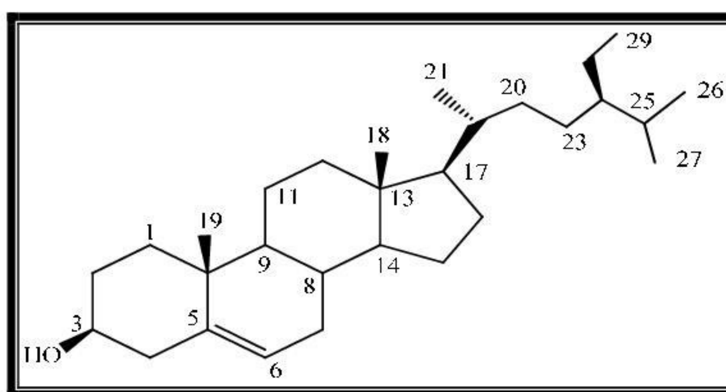
28 (CH_3)	25,4	1,02 sl	-
29 (CH_3)	14,0	0,86 *sl*	-
30 (CH_3)	19,3	0,95 *sl*	-
31 (CH_2)	105,9	4,71 s (H-31 b) 4,77 *s* (H-31 a)	- -

Tableau 3.2: Données RMN ^{1}H RMN ^{13}C (500 MHz) dans $CDCl_3$ du composé B

Ces données spectroscopiques ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +45,6$ (C = 0,26 g/100 ml, $CHCl_3$), conjuguées à celles de la littérature, permettent d'attribuer sans ambigüité à ce composé, la structure triterpénique suivante : 24-méthylènecycloartan-3*β*-ol (**B**). Ce triterpène a été isolé précédemment dans beaucoup d'espèces comme celles du genre *Euphorbia* [76, 77]. Il est encore décrit pour la première fois dans le genre *Reseda.*



3.2.3 Composé C



β-sitostérol (C)

Ce composé a été identifié au β-sitostérol, par comparaison avec un échantillon témoin. Les données RMN ^{1}H, ^{13}C *J*-modulé et masse ESI (m/z 414 $[M]^{+\cdot}$) et la valeur du pouvoir rotatoire [α] D = -30° (C= 0,80 g/100 ml, $CHCl_3$), en apportent la confirmation. Ce métabolite secondaire largement distribué dans le règne végétal et considéré comme métabolite commun, n'a pas été décrit dans le genre *Reseda,* voire la famille Resedaceae.

Cependant, on citera l'identification du β-sitostérol-3-*O*-β-glucopyranoside dans l'extrait méthanolique des parties aériennes de l'espèce *Oligomeris linifolia (Vahl) Macbr.* (Resedaceae) [78].

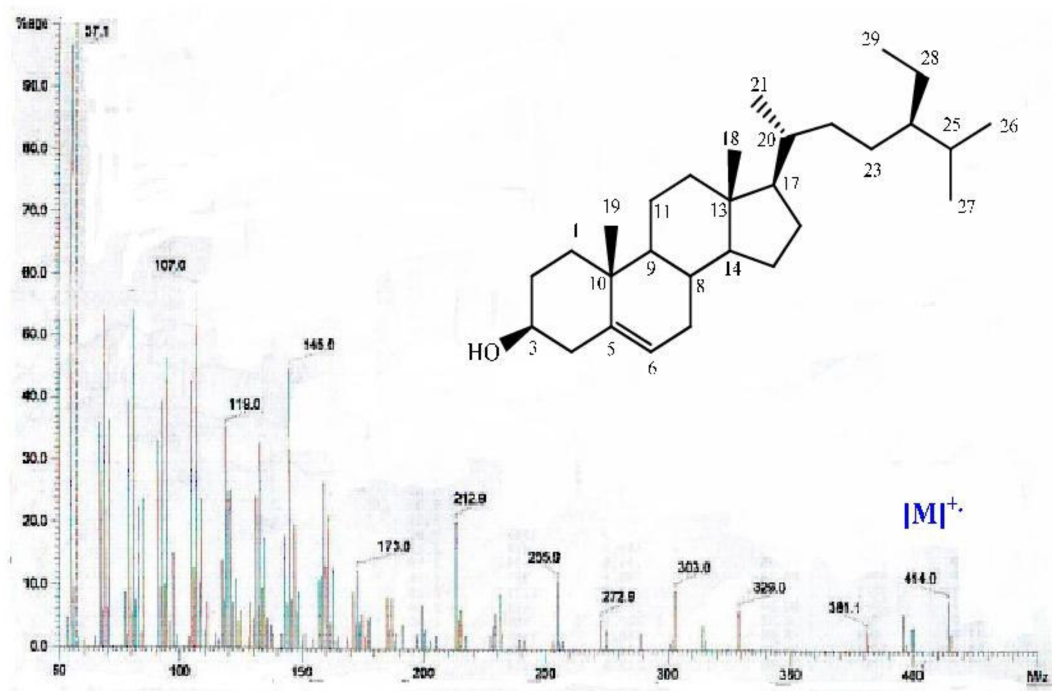


Figure 3.28: Spectre de masse du composé C

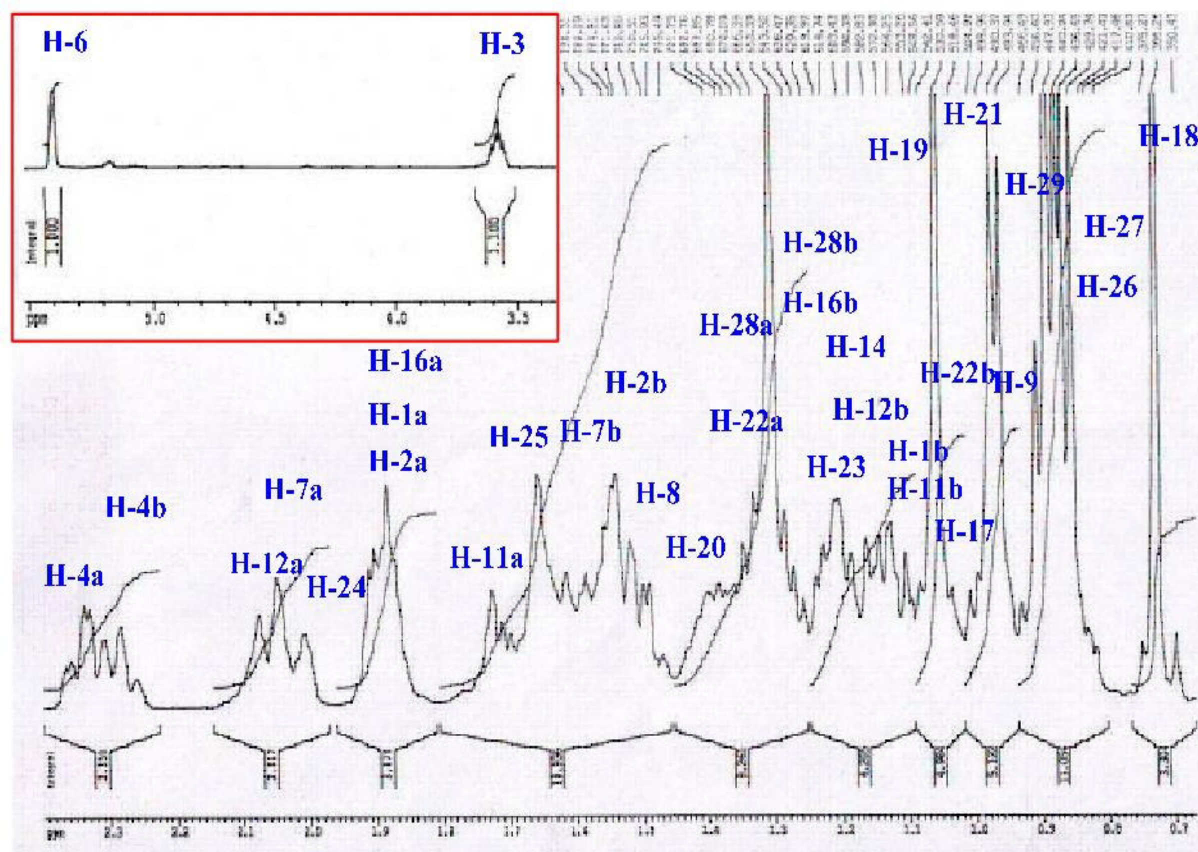


Figure 3.29 : Spectre RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du composé C

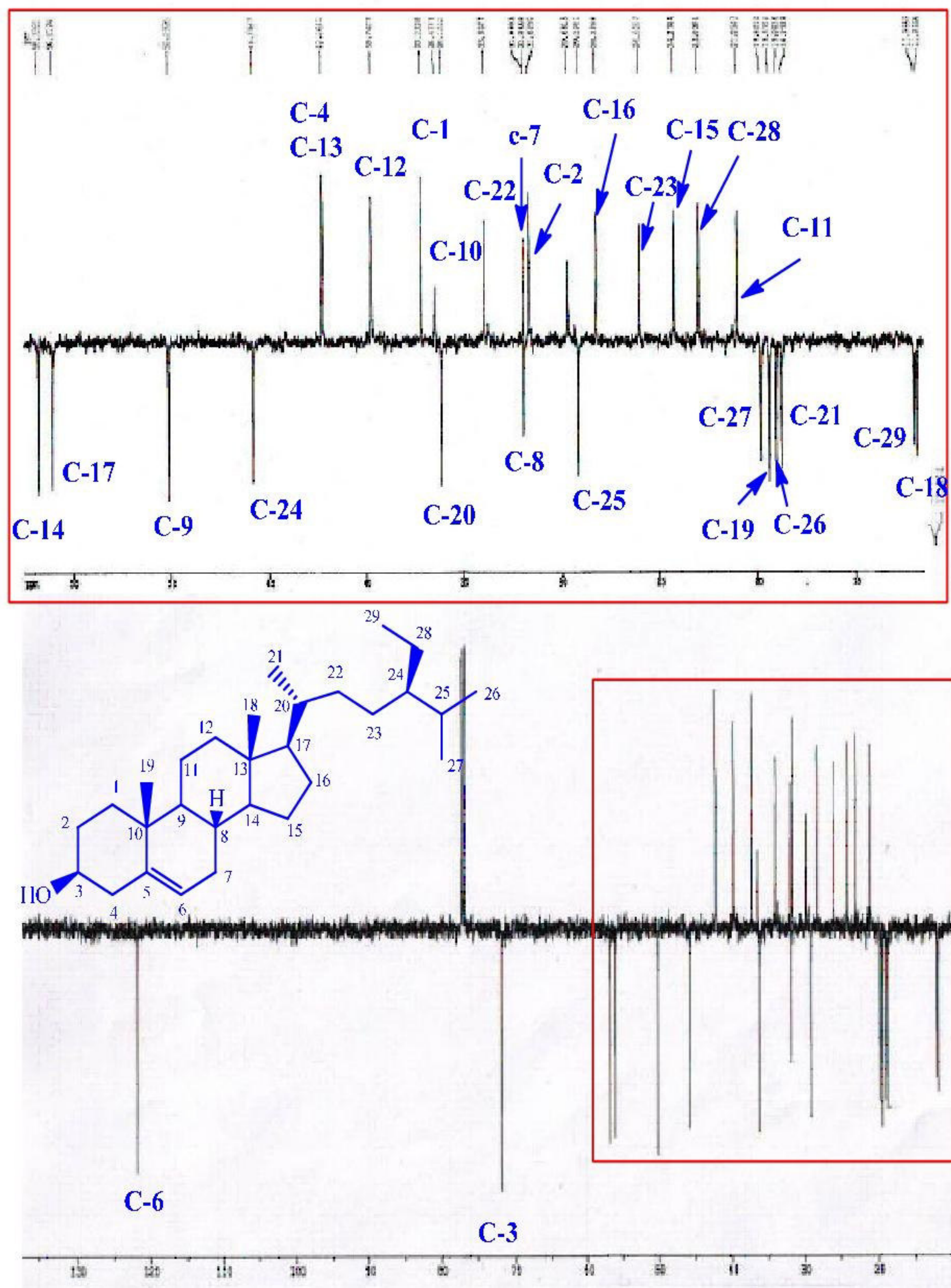


Figure 3.29 : Spectre RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du composé C

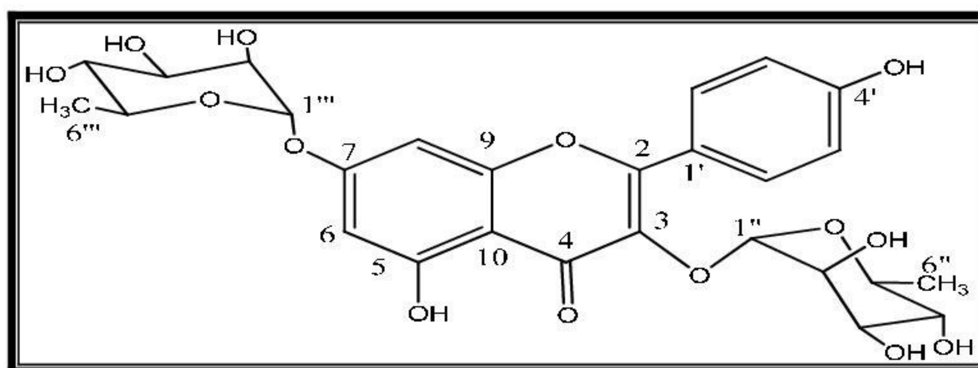
Les valeurs de déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **C** sont représentées dans le tableau 3.3.

Position	δ_C	δ_H (*m*, *J* en HZ)
1 (CH_2)	37,1	1,13 *m*, 1,90 *m*
2 (CH_2)	31,6	1,57 *m*, 1,90 *m*
3 (CH)	71,9	3,58 *sept* (10,5 ; 5,4)
4 (CH_2)	42,3	2,29 *m*, 2,35 *m*
5 (C)	140,7	-
6 (CH)	121,7	5,42 *m*
7 (CH_2)	31,9	2,03 *m*, 1,56 *m*
8 (CH)	31,7	1,50 *m*
9 (CH)	50,1	0,98 *m*
10 (C)	36,6	-
11(CH_2)	21,1	1,10 *m*, 1,77 *m*
12 (CH_2)	39,8	2,07 *m*, 1,20 *m*
13 (C)	42,3	-
14 (C)	56,0	1,15 *m*
15 (CH_2)	24,3	1 ,10 *m*, 1,62 *m*
16 (CH_2)	28,2	1,30 *m*, 1,88 *m*
17 (CH)	56,7	1,05 *m*
18 (CH_3)	11,8	0,73 *s*
19 (CH_3)	19,4	1,07 *s*
20 (CH)	36,0	1,40 *m*
21 (CH_3)	18,8	0,97 (*d*, 6,4)
22 (CH_2)	33,9	1,05 *m*, 1,37 *m*
23 (CH_2)	26,0	1,21 *m*
24 (CH)	45,8	197 *m*
25 (CH)	29,1	1,73 *m*
26 (CH_3)	19,0	0,86 *m*
27 (CH_3)	19,8	0,88 *m*
28 (CH_2)	23,0	1,33*m*, 1,27 *m*
29 (CH_3)	11,9	0,89 *m*

.**Tableau 3.3 : Données RMN ^{1}H et RMN ^{13}C (500 MHz) dans $CDCl_3$ du composé C**

3.3 Détermination de structure du composés isolé de l'extrait méthanolique

3.3.1 Composé D



kaempférol-3,7-di-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside (D)

Le composé **D**, visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune, après révélation par une solution acide puis chauffage, oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Le spectre UV (figure 3.30) présente deux bandes d'absorption maximale, l'une à 263 nm attribuée à l'absorption du système benzoyle (bande II), et l'autre à 340 nm caractéristique d'un système cinnamoyle (bande I). Ceci confirme la nature flavonoïdique de ce composé.

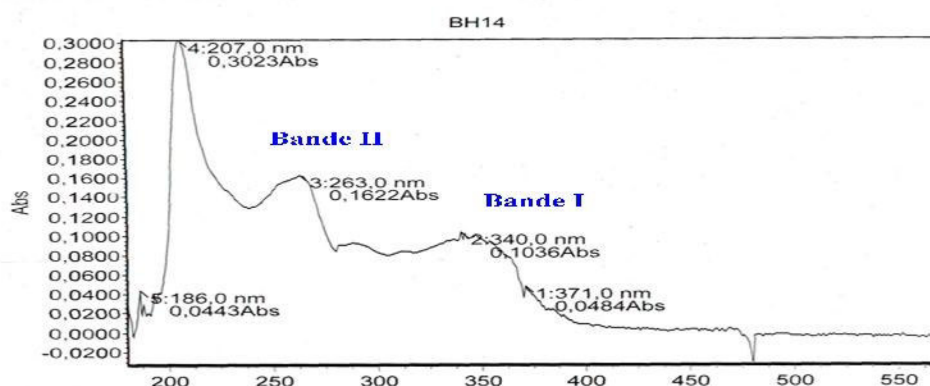


Figure 3.30: Spectre UV du composé D

Le spectre de masse (figure 3.31), obtenu en ionisation par électronébuliseur ou ESI (Electro Spray Ionisation) et enregistré en mode positif, présente un pic à *m/z* = 578.5 pour l'ion moléculaire $[M]^+$, soit une masse moléculaire de 578 uma, correspondant à une formule brute en $\mathbf{C_{27}O_{14}H_{30}}$. Le spectre montre également des fragments à :

- ✓ *m/z* = 432 $[M\text{-}146]^+$ correspondant à la perte d'un déoxyhexose.
- ✓ *m/z* = 286 $[M\text{-}146\text{-}146]^+$ correspondant à la perte d'un second déoxyhexose.

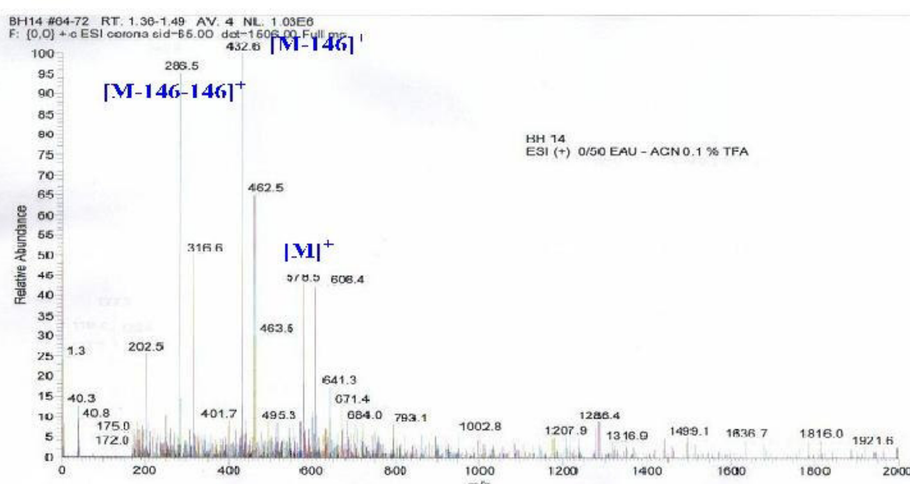


Figure 3.31: Spectre de masse ESI en mode positif du composé D

Le spectre RMN [1]H (figure 3.32) du composé **D** enregistré dans CD_3OD présente globalement des signaux caractéristiques de protons aromatiques résonant entre 6,4 et 7,9 ppm, et osidiques entre 3,2 et 5,7 ppm, confirmant que le composé **D** est un flavonoïde glycosylé. Ce spectre met aussi en évidence la présence de deux groupements méthyles à travers deux signaux résonant à δ_H 0,96 (3H, *d*, *J* = 4,0 Hz) et δ_H 1,30 (3H, *d*, *J* = 6,2 Hz).

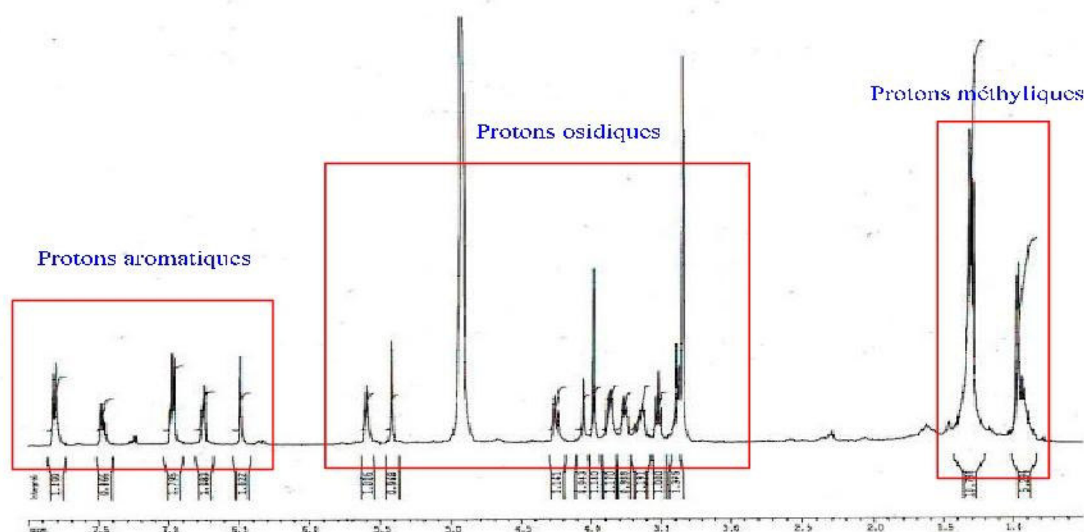


Figure 3.32: Spectre RMN ^{1}H du composé D

Ce spectre (Figure 3.33) montre :

- ✓ deux signaux à δ_H 6,49 (1H, *s*) et δ_H 6,75 (1H, *s*) correspondant respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en positions 5 et 7.
- ✓ deux signaux doublets déblindés d'intégration 2H chacun résonant à δ_H 7,82 (2H, *d*, *J* = 8,6 Hz,) et δ_H 6.97 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz) correspondant respectivement aux protons équivalents H-2′/H-6′ et H-3′/H-5′ du cycle B parasubstitué.

Ces signaux constituent la partie aglycone du composé.

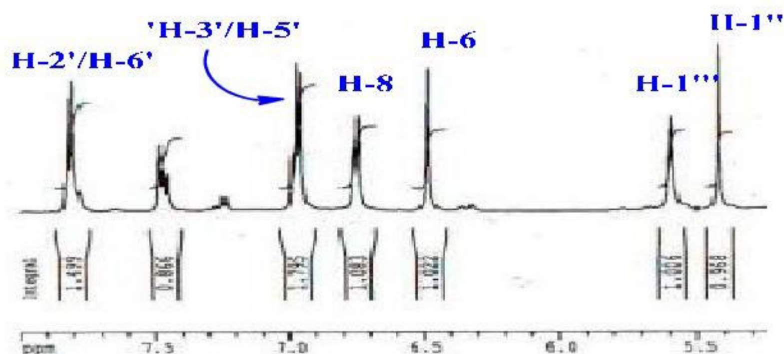


Figure 3.33: Spectre RMN ^{1}H du composé D

Ce constat est confirmé par analyse du spectre COSY H-H (Figure 3.34).

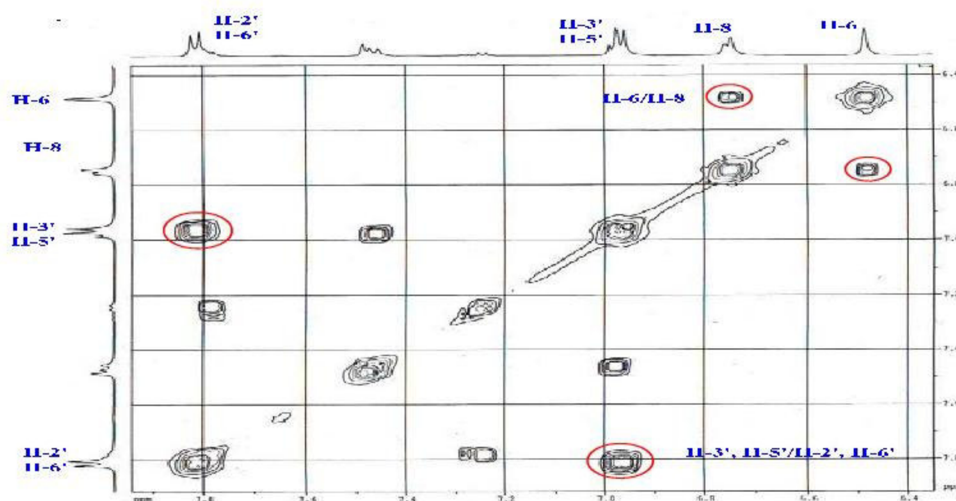


Figure 3.34: Spectre COSY H-H du composé D

Par ailleurs, en plus des signaux de protons osidiques (3,20 – 4,40 ppm) cités précédemment, l'observation de deux signaux d'intégration 1H chacun à 5,42 et 5,59 ppm caractéristiques de protons anomères (H-1'' et H-1''') des sucres, établit la présence de deux unités osidiques (Figure 3.33). L'apparition de deux groupements méthyles à δ_H 0,96 (3H, *d*, *J* = 4,0 Hz) et 1,30 (3H, *d*, *J* = 6,2 Hz) et l'analyse du spectre de masse indiquant la présence de deux déoxyhexoses, suggèrent que les deux unités osidiques sont des rhamnopyranoses.

A partir des protons cités précédemment, l'expérience héteronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure 3.35). Ces derniers sont repérés à δ_C 99,1 (C-6), 94,1 (C-8), 130,5 (C-2', C-6'), 115,1 (C-3', C-5'), 102,0 (C-1'') et 98,4 (C-1''').

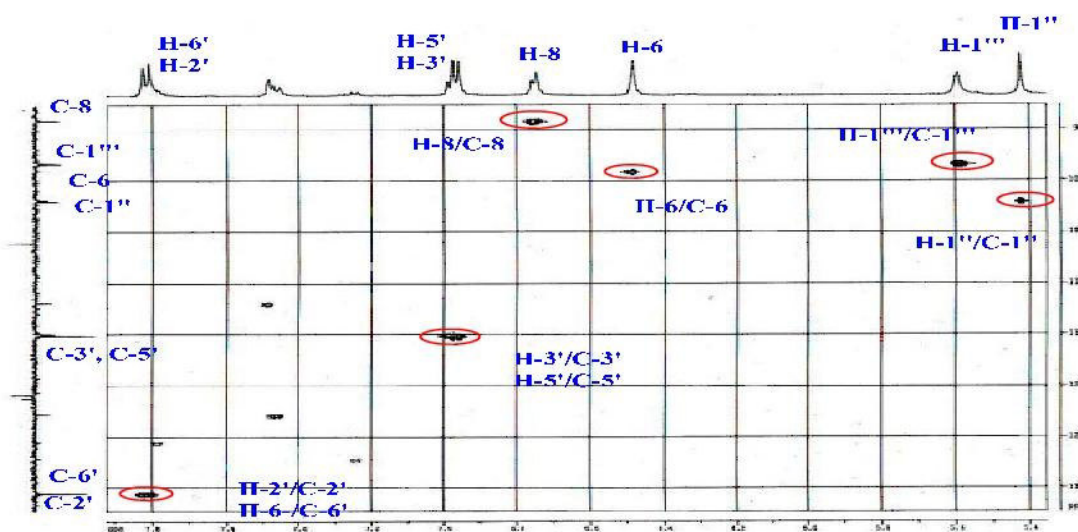


Figure 3.35: Spectre HSQC du composé D

A l'issue de cette première analyse, il apparait que le composé **D** est un flavonoïde di-substitué sur le cycle A et parasubstitué sur le cycle B. Il est aussi porteur de deux unités

osidiques, des rhamnopyranoses mais dont il reste toutefois à confirmer leur nature ainsi que leur point de branchement sur la génine qui reste aussi à identifier.

Identification de la partie aglycone

L'identification de la génine à un flavonol, plus précisément un kaempférol glycosylé en C-3, est faite sur la base de la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 égale à 158,3 ppm. Cette dernière est déduite du spectre HMBC (Figure 3.36) qui montre clairement une corrélation entre les protons H-2′/H-6′ du cycle B et ce carbone.

L'analyse du spectre HMBC (Figure 3.36) permet également de visualiser les corrélations entre :

- ✓ les protons H-3′/H-5′ du cycle B et deux carbones quaternaires résonant à δ_C 120,9 et 160,3 attribuables respectivement aux carbones C-1′ et C-4′oxygéné.
- ✓ les protons H-2′/H-6′et le carbone oxygéné C-4′ (δ_C 160,3) ainsi que le carbone quaternaire C-2 (δ_C 158,3) du cycle C.
- ✓ le proton H-8 (δ_H 6,75) et trois carbones quaternaires à δ_C 162,1, 156,6 et 106,1 attribuables respectivement aux deux carbones oxygénés C-7, C-9 et le carbone C-10.
- ✓ le proton H-6 (δ_H 6,49) et deux carbones quaternaires oxygénés à δ_C 161,5 et 162,1, ne pouvant être que C-5 et C-7, ainsi que le carbone C-10 (δ_C 106,1).

Le spectre HMBC permet d'observer également les couplages H-6/C-8, H-3′/C-5′, H-5′/C-3', H-2′/C-6′ et H-6′/C-2′ (Figure 3.36).

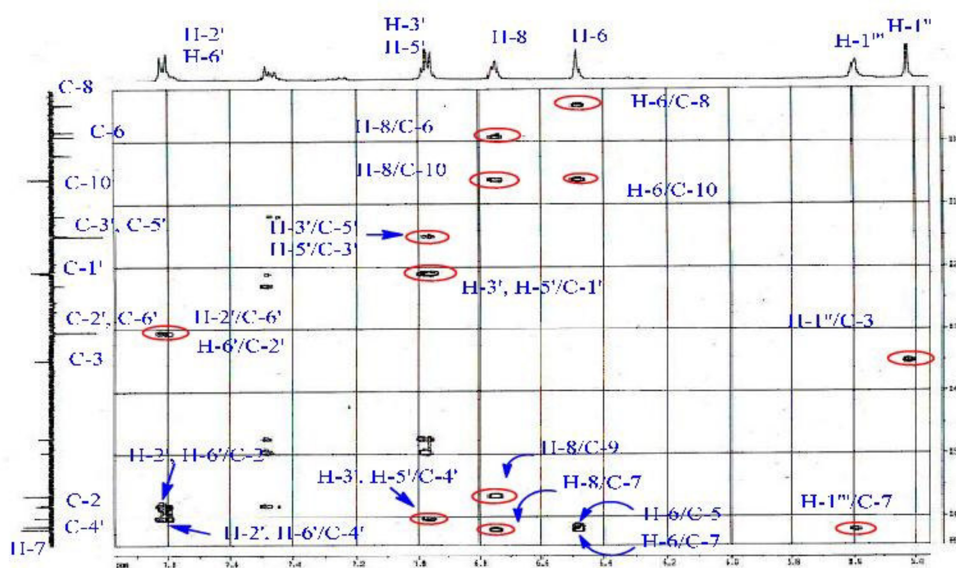


Figure 3.36: Spectre HMBC du composé D

Le signal carbone résonant à δ_C 135,0 attribuable au carbone C-3 est confirmé par HMBC (Figure 3.36) du fait de sa corrélation longue distance avec le proton anomère repéré à δ_H 5,42 d'une unité osidique. Sa valeur de déplacement chimique confirme la glycosylation en cette position du flavonol. Le signal apparaissant à 178,3 ppm (Figure 3.37) est attribué au carbone C-4 de carbonyle.

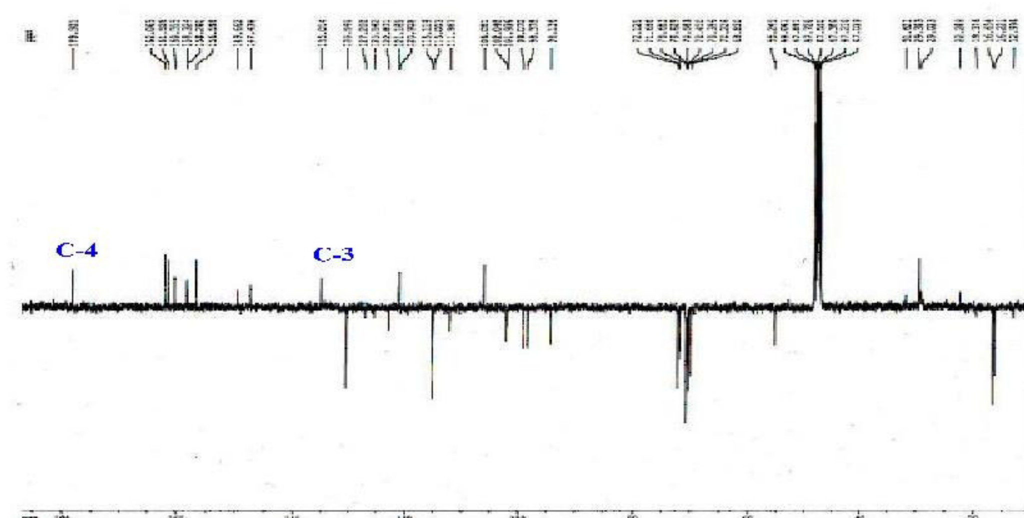
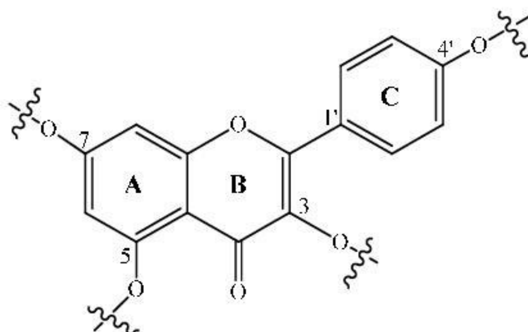


Figure 3.37: Spectre RMN ^{13}C du composé D

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier l'aglycone comme étant le Kaempférol, glycosylé en C-3.



Identification de la partie osidique

Cette identification est effectuée au moyen de l'expérience COSY H-H (Figures 3.38 et 3.39).

Partant du premier proton anomère H-1″ sortant à δ_H 5,42 (1H, *d*, *J* = 1,5 Hz), un système de spins à huit protons est visualisé à travers les corrélations (Figure 3.38) :

- H-1″/H-2″ [δ_H 4,25 (1H, *dd*, *J* = 3,1 ; 1,5 Hz)]
- H-2″/H-3″ [δ_H 3,75 (1H *dd*, *J* = 8,5 ; 3,1Hz)]

- H-3″/H-4″ [δ_H 3,38 (1H, *t*, *J* = 8,4 Hz)]
- H-4″/H-5″ [δ_H 3,34 (1H, *nd*]
- H-5″/H_3-6″ [δ_H 0,96 (3H, *d*, *J* = 4,0 Hz)]

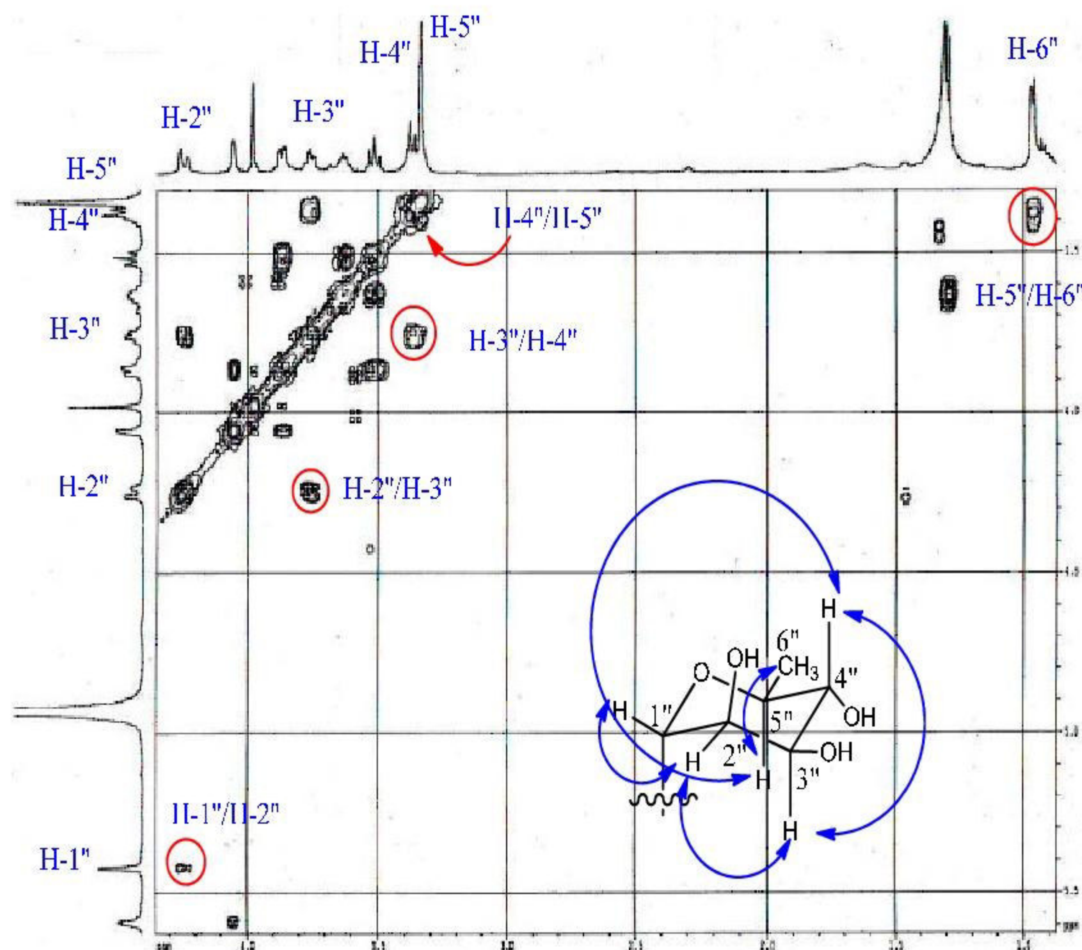


Figure 3.38 : Spectre COSY H-H de la première unité osidique du composé D

L'ensemble des corrélations observées montrent que ce sucre est un déoxyhexose. Les valeurs de constantes de couplages confirment qu'il s'agit donc d'un rhamnose de configuration *α*. Configuration déduite de la valeur de la constante de couplage $J_{1''\text{-}2''}$ = 1,5 Hz.

Partant du deuxième proton anomère H-1‴ [δ_H 5,59 (*s*)], il est détecté sur le spectre COSY H-H (Figure 3.36) un autre système de spins à huit protons d'un déoxyhexose, et cela à travers les couplages : H-1‴/H-2‴ [δ_H 4,60 (1H, *sl*)], H-2‴/H-3‴ [δ_H 3,87 (1H, *dd*, *J* = 9,2 ; 2,9 Hz)], H-3‴/H-4‴ [δ_H 3,51 (1H, *t*, *J* = 9,5 Hz)], H-4‴/H-5‴ [δ_H 3,63 (1H, *nd*)] et enfin H-5‴/H_3-6‴ [δ_H 1,30 (3H, *d*, *J* = 6,2 Hz)]. Les valeurs de constantes de couplages confirment qu'il s'agit ici aussi d'un rhamnose de configuration *α*.

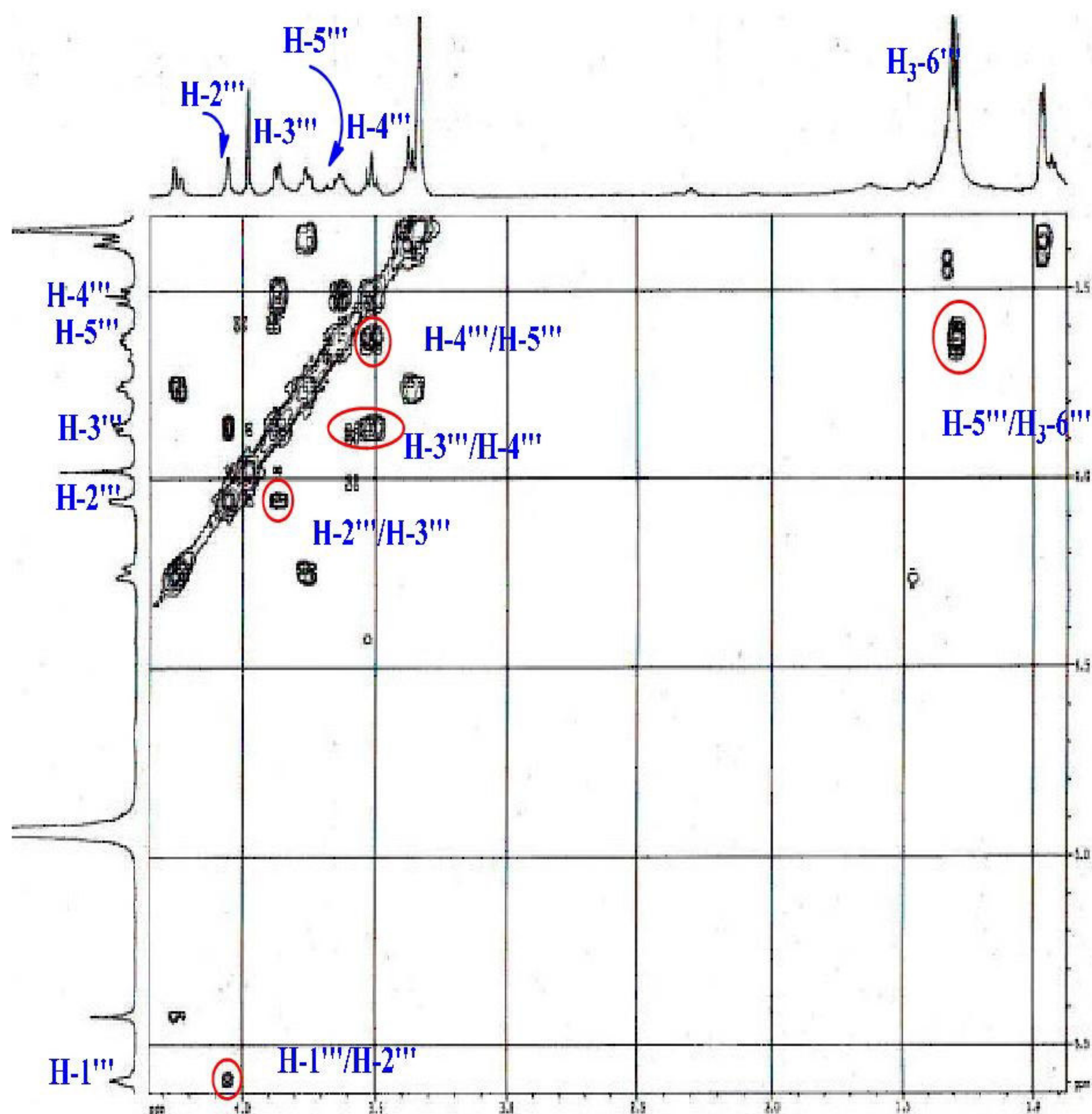


Figure 3.39: Spectre COSY H-H de la deuxième unité osidique du composé D

Les carbones de ces unités osidiques ont été caractérisés par expérience HSQC (Figure 3.40) qui montre, en plus des corrélations observées entre les protons et carbones anomères, d'autres couplages hétéronucléaires directs entre :

- ✓ les protons H-2″, H-3″, H-4″, H-5″ et H_3-6″ du rhamnose et leurs carbones résonnant respectivement à δ_C 70.5 (C-2″), 70.1 (C-3″), 70.7 (C-4″), 71.7 (C-5″) et 16.2 ppm (C-6″).
- ✓ les protons H-2‴, H-3‴, H-4‴, H-5‴ et H-6‴ du deuxième rhamnose et leurs carbones résonnant respectivement à δ_C = 70.3 (C-2‴), 70.7 (C-3‴), 72.1 (C-4‴), 69.8 (C-5‴) et 16.6 ppm (C-6‴).

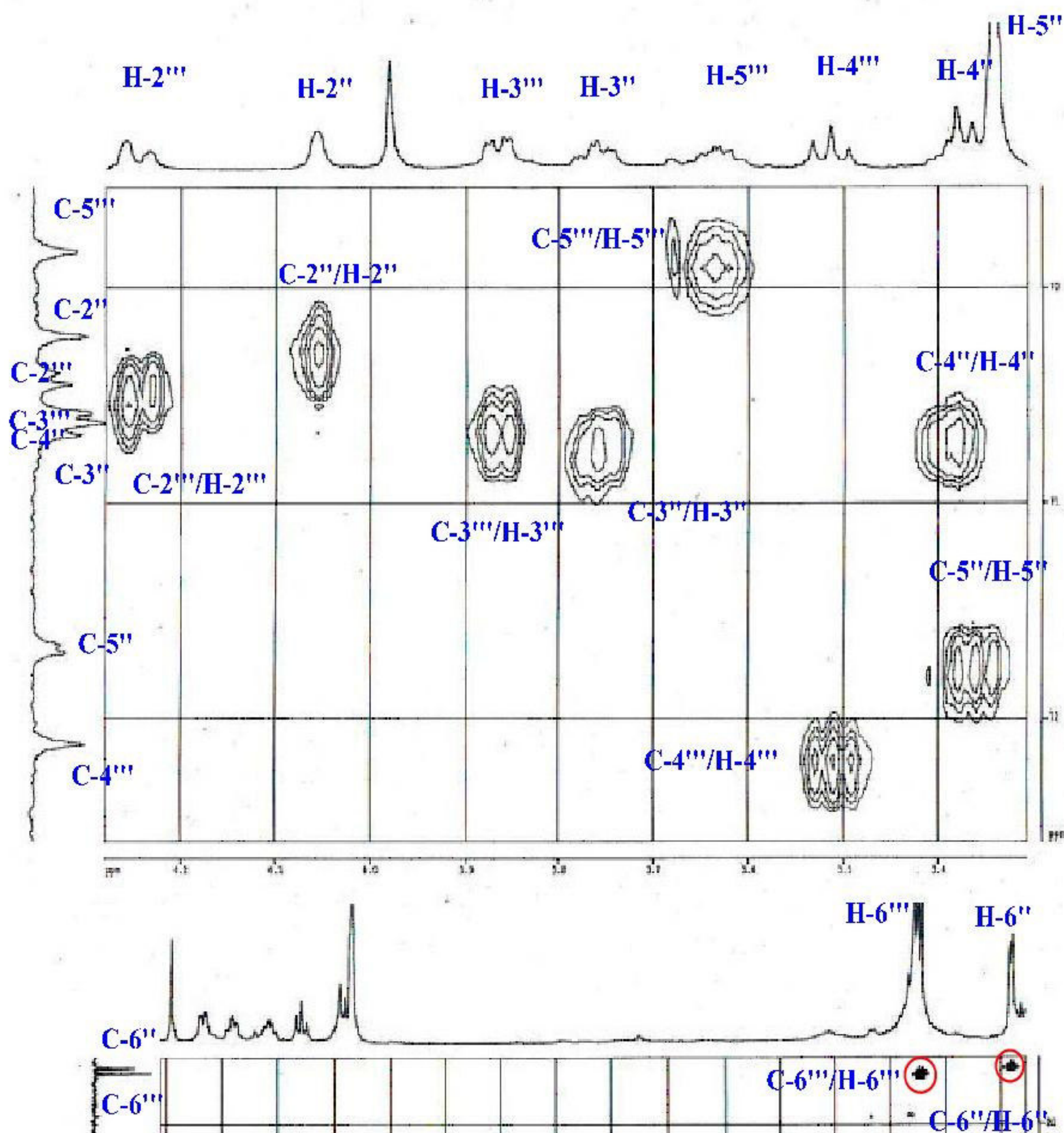


Figure 3.40: Spectre HSQC du composé D

L'enchainement des sucres a été déterminé au moyen de l'expérience HMBC (Figure 3.41). En effet on observe des corrélations entre :

- ✓ le carbone C-3 (δ_C 135,0) de la génine et le proton anomère H-1″ (δ_H 5,42). Ceci indique la substitution de l'hydroxyle en C-3 du kaempférol (génine), par un *O*-α-L-rhamnose.
- ✓ le carbone C-7 de la génine (δ_C 162,1) identifié par HMBC et le proton anomère H-1‴ (δ_H 5,59), établissant une substitution en cette position par le second rhamnopyranose.

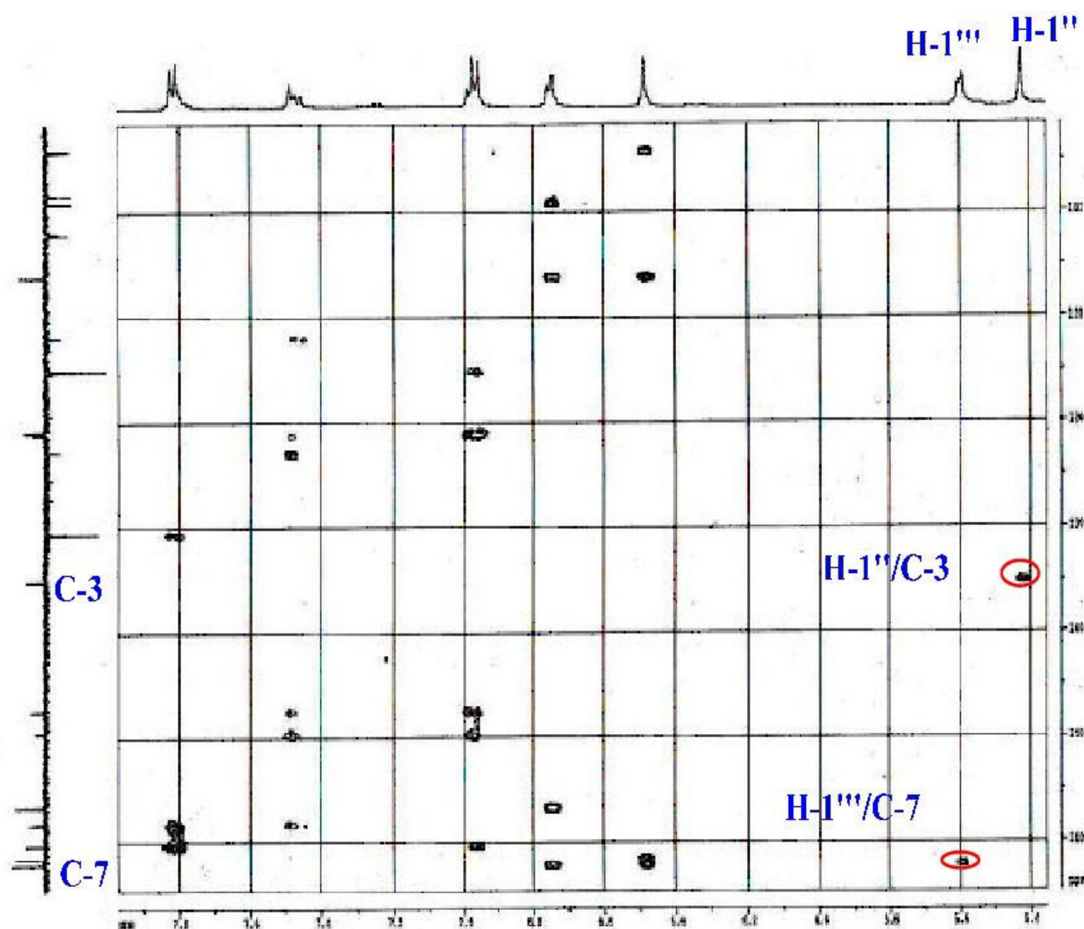
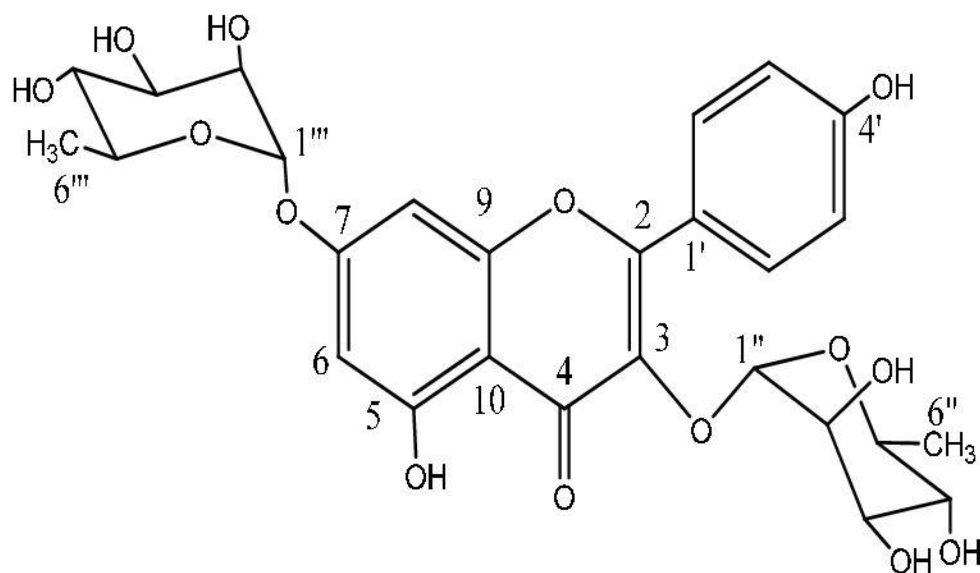


Figure 3.41: Spectre HMBC du composé D

Enfin, l'ensemble de ces données conjuguées à celles de la littérature [12, 68], confirme la structure du composé **D** comme étant le : kaempférol-3,7-di-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside. Ce compose a été isolé du genre *Reseda,* à partir de l'espèce *R. villosa* [9].



Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau 3.4.

Position	δ_C	δ_H (*m*, *J* en Hz)
2 (C)	158,3	-
3 (C)	135,0	-
4 (C)	178,3	-
5 (C)	161,5	-
6 (CH)	99,1	6,49 (*s*)
7 (C)	162,1	-
8 (CH)	94,1	6,75 (*s*)
9 (C)	156,6	-
10 (C)	106,1	-
1′ (C)	120,9	-
2′ (CH)	130,5	7,82 (*d*, 8,6)
3′ (CH)	115,1	6,97 (*d*, 8,5)
4′ (C)	160,3	-
5′ (CH)	115,1	6,97 (*d*, 8,5)
6′ (CH)	130,5	7,82 (*d*, 8,6)
1″ (CH)	102,0	5,42 (*d*, 1,5)
2″ (CH)	70,5	4,25 (*dd*, 3,1 ; 1,5)
3″ (CH)	70,1	3,75 (*dd*, 8,7 ; 3,1)
4″ (CH)	70,7	3,38 (*nd*)
5″ (CH)	71,7	3,34 (*sl*)
6″ (CH_3)	16,2	0,96 (*d*, 4,0)
1‴ (CH)	98,4	5,59 (*s*)
2‴ (CH)	70,3	4,60 (*s*)
3‴ (CH)	70,7	3,87 (*dd*, 9,2 ; 2,9)
4‴ (CH)	72,1	3,51 (*t*, 9,5)
5‴ (CH)	69,8	3,63 (*nd*)
6‴ (CH_3)	16,6	1,30 (*d*, 6,2)

Tableau 3.4 : Données spéctrales RMN ^{1}H et ^{13}C du composé D

Conclusion

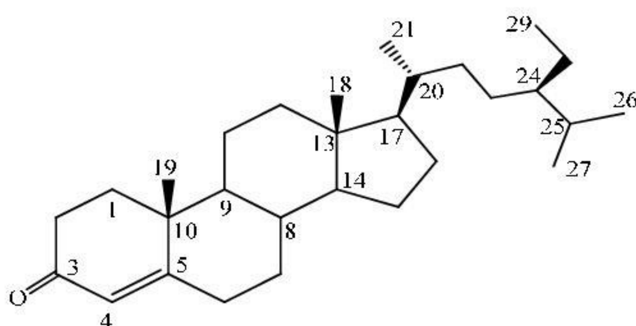
CONCLUSION

Le présent travail reporte une étude chimique réalisée sur les extraits acétate d'éthyle et méthanolique des parties aériennes de l'espèce *Reseda alphonsii* de la famille Resedaceae, plante saharienne endémique à l'Afrique du Nord. Au cours de cette investigation destinée à la connaissance des constituants chimiques de cette espèce, quatre composés que sont stigmast-4-èn-3-one (**A**), 24-méthylènecycloartan-3β-ol (**B**), stigmast-5-èn-3β-ol plus connu sous le nom de β-sitostérol (**C**) et kaempférol-3,7-di-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside (**D**), ont été isolés par différentes méthodes chromatographiques.

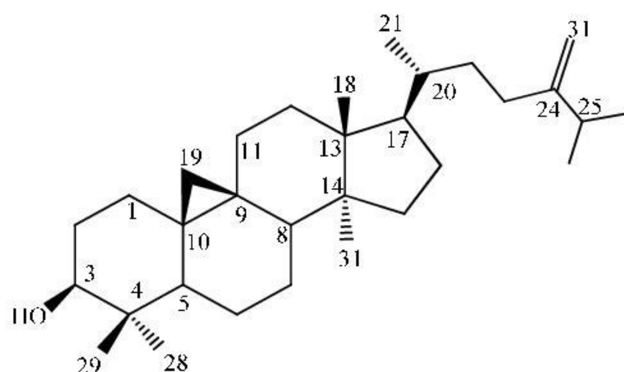
L'extrait acétate d'éthyle a fourni un triterpène de nature cycloartanique **B** ainsi que deux composés **A** et **C** de nature stéroïdique. Si ce dernier (**C**) est un métabolite secondaire commun dans le règne végétal, il n'en est pas de même pour les deux autres **A** et **B**. Ces deux composés identifiés précédemment dans un nombre très limité de plantes : *Pinus taeda* [78], *Quassia amara* [80] pour **A,** et *Euphorbia aleppica* [83] et *Larix kaempferi* [84] pour **B,** sont isolés pour la première fois dans le genre *Reseda* ainsi que dans la famille Resedaceae. L'extrait méthanolique a donné un flavonoïde glycosylé **D**. Ce dernier a été isolé antérieurement de l'espèce *Reseda villosa* [9].

L'élucidation structurale de ces composés a été réalisée au moyen des méthodes modernes d'analyse spectroscopiques RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC, NOESY, la spectrométrie de masse EI-MS et par comparaison avec les données de la littérature.

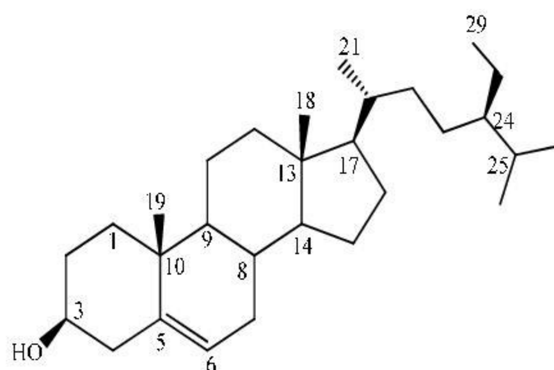
Ce travail est une contribution à la connaissance des métabolites secondaires de l'espèce *R. alphonsii*. Les structures des quatre composés isolés **A**, **B**, **C** et **D** correspondent aux formules suivantes :



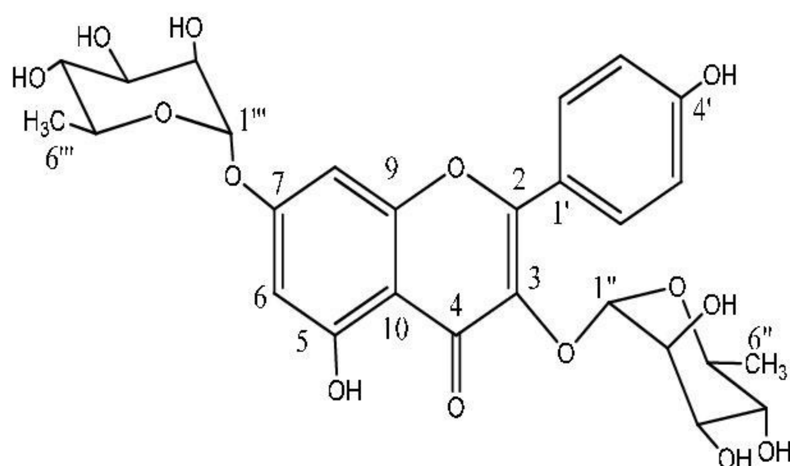
Stigmast-4-èn-3-one A



24-méthylènecycloartan-3β-ol B



Stigmast-5-èn-3β-ol (β-sitostérol) C



kaempférol-3,7-di-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside D

Chapitre 4
Partie expérimentale

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Matériel végétal et extraction

La plante *Reseda alphonsii*, objet de cette étude, a été récoltée dans le région de Biskra. La détermination botanique de l'espèce a été réalisée par le Professeur Bachir OUDJEHIH du Département d'Agronomie de l'Université de Batna. le matériel végétal est ensuite séché à température ambiante et à labri de la lumière, puis finement broyé de manière à ce que la surface de contact avec le solvant soit la plus grande possible, et cela pour une optimisation maximale des rendements de l'extraction. La méthode d'extraction se résume à une macération successive par trois solvants de polarité croissante (Hexane, acétate d'éthyle puis méthanol). Le rapport entre le matériel à extraire et le volume de solvants utilisés est de 1g/10 ml. Les extraits obtenus sont ensuite stockés à basse température et à l'abri de la lumière jusqu'à leur exploitation.

4.1.2 Techniques analytiques de séparation

4.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de Silice Kieselgel 60 F254 à support aluminium (Merck) et silice RP-18. Après développement dans des cuves en verre (Camag), les plaques ont été observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm, et révélées par la vanilline sulfurique et chauffées avec un sèche-cheveux jusqu'à apparition de taches de diverses couleurs sur un fond jaunâtre.

4.1.3. Techniques préparatives de séparation

4.1.3.1 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

a. Chromatographie d'adsorption

Des colonnes ouvertes sur gel de silice 60 (320-400-mesh) et silice RP-18 ont été utilisées dans la première ou seconde étape de fractionnement des extraits. La taille des colonnes, le débit de la phase mobile et la taille des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi- de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyse par CCM.

b. Chromatographie d'exclusion

Les chromatographies d'exclusion ou filtration sur gel ont été réalisées comme étapes de fractionnement visant à séparer les molécules par leur volume et polarité. Elles ont été effectuées sur Sephadex LH-20 dans le méthanol comme phase mobile.

4.1.3.2. Chromatographie préparative sur couche épaisse (C.C.E)

Les Chromatographies préparatives sur couche épaisse ont été effectuées sur des plaques de Silice Kieselgel 60 F254 (Merck) et silice RP-18. Après, les plaques ont été observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm.

4.1.4 Méthodes physico-chimiques

4.1.4.1 Spectres ultraviolets (UV)

Les spectres UV des composés naturels sont enregistrés dans une solution de méthanol sur un appareil de type Beckman Du-600, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France).

4.1.3.2 Spectres de masse (SM)

Les spectres de masse des produits isolés ont été enregistrés en electroflash ESI (Electro Spray Ionisation), en modes négatif et positif sur un spectromètre de masse de type BRUCKER LC-MS/MS type esquire-LC, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France).

4.1.3.3 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN ^{1}H et RMN ^{13}C (RMN 1D et 2D) sont enregistrés dans $CDCl_3$ et CD_3OD sur un appareil BRUCKER à 500 MHz et 125 MHz respectivement, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles UMS CNRS-Pierre Fabre 2597-Toulouse (France). Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, et les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

4.1.3.4 Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des composés a été déterminé au moyen d'un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à 20 °C. La mesure a été réalisée dans une cuve de 1 ml et d'une longueur de 10 cm, en utilisant la raie D du sodium (589 nm) comme source lumineuse. La valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$) est exprimée en degrés.

4.2 Extraction

Le protocole d'extraction des parties aériennes de la plante a été antérieurement décrit dans la partie résultats et discussions (page 43).

4.3 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

Une chromatographie sur colonne de gel de silice normale est effectuée sur 8,5 g d'extrait acétate d'éthyle. L'élution est réalisée par le *n*-hexane pur puis un mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle, ensuite par un mélange acétate d'éthyle-méthanol, et enfin par du méthanol pur. A l'issue de ce fractionnement, 764 fractions ont été obtenues. L'analyse sur CCM de ces fractions, après révélation à la lumière UV (256 et 366 nm) et à la vanilline sulfurique, a permis de les rassembler en 51 lots (S1-S51). Les résultats de ce traitement sont résumés dans le tableau 4.1. Toutes les fractions issues de cette colonne sont des mélanges plus ou moins complexes nécessitant d'autres traitements de purification.

ots	**Fractions**	**Eluant**	**Masse (mg)**
S 1	1-7	*n*-hexane 100%	0,9
S2	8-14	//	8,2
S3	15-25	*n*-hexane/AcOEt – 97/3	33,7
S4	26-93	//	662,7
S5	94-119	*n*-hexane/AcOEt – 95/5	106
S6	120-130	//	78,3
S7	131-159	//	70
S8	160-169	//	15,4
S9	170-175	//	8,4
S10	176-209	//	375,2
S11	210-227	//	142,1
S12	228-234	//	30,2
S13	235-246	*n*-hexane/AcOEt – 90/10	52,8
S14	247-258	//	136
S15	259-267	//	86,2
S16	268-279	//	90,9
S17	280-306	//	181
S18	307-342	//	24,7
S19	343-349	//	15,3
S20	350-354	//	153,7
S21	355-390	//	27,5
S22	391-409	//	26,1
S23	410-415	//	8,2
S24	416-456	//	93,4
S25	457-461	*n*-hexane/AcOEt – 80/20	40,1
S26	462-470	//	79,7
S27	471-478	//	75,9
S28	479-488	//	63,1
S29	489-506	//	81,1
S30	407-520	//	40,7
S31	521-542	//	30,8

S32	543-554	//	21,2
S33	555-566	*n*-hexane/AcOEt – 70/30	21,3
S34	567-578	//	4,7
S35	579-590	//	35,5
S36	591-602	//	31,9
S37	603-614	//	19,3
S38	615-626	*n*-hexane/AcOEt – 50/50	42,1
S39	627-638	*n*-hexane/AcOEt – 20/80	64,6
S40	639-652	AcOEt 100%	220,2
S41	653-665	AcOEt/MeOH – 90/10	151,4
S42	666-669	//	260,6
S43	670-680	//	86,4
S44	681-705	//	46,6
S45	706-724	AcOEt/MeOH – 80/20	75
S46	725-726	//	16,3
S47	727-756	//	90
S48	757	MeOH 100 %	10,3
S49	758	//	3,8
S50	759-760	//	118,6
S51	761-764	//	96,2

Tableau 4.1 : Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes

Etude du lot S5

Les fractions 94-119 constituant ce lot (Tableau 4.1) d'un poids de 106 mg, ont été soumises à une nouvelle chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée avec un mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle à gradients différents.

Des fractions de 50 ml sont recueillies à chaque fois puis soumises à analyse CCM. Elles sont rassemblées (Tableau 4.2) en fonction de leur profil chromatographique.

Lots	Fractions	Eluant	Poids (mg)
B1	1-28	*n*-hexane 100%	36,1
B2	29-37	*n*-hexane/$CHCl_3$ – 97/3	17,6
B3	38-42	//	38,6
B4	43-45	//	20,6
B5	46-52	//	4,2
B6	53-56	//	3,1
B7	57-76	*n*-hexane/$CHCl_3$ – 95/5	4,9
B8	77-78	//	2,6
B9	79-86	//	71,1
B10	87-101	*n*-hexane/$CHCl_3$ – 90/10	3,8
B11	102-115	//	7,.2
B12	116	//	50

B13	117-118	//	2,9
B14	119-122	//	1,1
B15	123-126	//	0,8
B16	127	*n*-hexane/$CHCl_3$ – 85/15	1,1
B17	128	//	17,4
B18	129	//	1,2
B19	130-131	//	2,1
B20	132-137	*n*-hexane/$CHCl_3$ – 80/20	1,4
B21	138-146	//	2,6
B22	147-152	*n*-hexane/$CHCl_3$ –70/30	3,8
B23	153-156	*n*-hexane /$CHCl_3$ – 50/50	17,.3
B24	157-159	//	4,7
B25	160-172	*n*-hexane/$CHCl_3$ – 40/60	1,.2
B26	173-179	*n*-hexane/$CHCl_3$ – 20/80	3,3
B27	180-181	//	2,5
B28	182-192	//	0,5
B29	193-195	$CHCl_3$ 100 %	3,8
B30	196-198	//	4,7

Tableau 4.2 : Fractionnement du Lot S5 de l'extrait acétate d'éthyle

Etude du sous lot B12

La fraction 116 (Tableau 4.2) d'une masse de 50 mg, a été soumise à une nouvelle chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée avec un mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle à gradients différents. Le fractionnement de ce lot a été réalisé comme suit (Tableau 4.3) :

Lots	Fractions	Eluant	Poid (mg)
C1	1-18	*n*-hexane/AcOEt – 99/1	0,9
C2	19-20	//	5,6
C3	21-77	//	4,4
C4	78-81	//	1,1
C5	82-92	//	2,2
C6	93-104	//	2,0
C7	105-114	//	1,6
C8	115-126	//	1,5
C9	127-156	//	19,4
C10	157-162	//	1,2
C11	163-170	*n*-hexane/AcOEt – 97/3	6,8
C12	171-174	//	3,8
C13	175-198	//	2,7
C14	199-206	*n*-hexane/AcOEt – 95/5	2,3
C15	207210	//	3,7
C16	211-222	//	1,2
C17	223-232	//	1,2
C18	233-246	//	2,1
C19	247-259	//	0,4

C20	260-272	//	0,9
C21	273-282	AcOEt %	liquide

Tableau 4.3: Fractionnement du Lot B12 de l'extrait acétate d'éthyle

La purification finale de C9 (19.4 mg) par chromatographie préparative CCE en phase normale (éluant: *n*-hexane/acétate d'éthyle: 80/20) a permis d'obtenir le composé **A** pur (2,2 mg).

Etude des lots S6 et S7

Les lots S6 et S7 (Tableau 4.1), de masse égale à 148,3 mg, ont été chromatographiés sur une colonne de gel de silice en phase normale, préparée dans le *n*-hexane puis éluée par un mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle à divers gradients. Ce fractionnement nous a permis d'obtenir 25 sous-fractions (D1-D25) (Tableau 4.4).

Lots	Fractions	Eluant	Poid (mg)
D1	1-2	*n*-hexane/AcOEt – 98/2	14,6
D2	3-4	//	2,9
D3	5-8	//	0,5
D4	9-10	//	5,9
D5	11-13	//	1,8
D6	14-24	//	3,5
D7	25-27	//	5,7
D8	28	//	2,3
D9	29-32	//	11,6
D10	33-35	//	4,7
D11	36-37	//	2,2
D12	38-46	//	10,4
D13	47-55	*n*-hexane/AcOEt – 97/3	30,3
D14	56-77	*n*-hexane/AcOEt – 96/4	30,2
D15	78-81	*n*-hexane/AcOEt – 90/0	2,6
D16	82-83	//	2,8
D17	84-86	//	3,5
D18	87-90	//	3,1
D19	91-103	*n*-hexane/AcOEt – 80/20	4,2
D20	104-110	//	5,4
D21	111-127	//	4,9
D22	128-134	*n*-hexane/AcOEt – 60/40	7,4
D23	135-147	//	3,5
D24	148-161	*n*-hexane/AcOEt – 80/20	8,1
D25	162	AcOEt 100%	2,6

Tableau 4.4: Fractionnement des Lots S6 et S7 de l'extrait acétate d'éthyle

Le traitement des fractions D7, D8 et D9 de masse égale à 19,6 mg, par chromatographie préparative CCE en phase normale (éluant: n-hexane/acétate d'éthyle: 80/20) a permis d'isoler les composés **B** (5,5 mg) et **C** (2,2 mg) à l'état pur.

4.4 Fractionnement et purification de l'extrait méthanolique

Un premier fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (10 g), a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice pour donner 590 fractions. L'analyse sur CCM de ces fractions, après révélation à la lumière UV (254 nm et 366 nm) et à la vanilline sulfurique, a permis de les rassembler en 45 lots (M1-M45). L'élution est réalisée par le chloroforme pur, puis des mélanges chloroforme-méthanol et méthanol-eau à différents gradients, et enfin par de l'eau. Le fractionnement de cet extrait est récapitulé dans le tableau 4.5.

Lots	Fractions	Eluant	Poid (mg)
M1	9-12	$CHCl_3$ %	13,3
M2	13-14	//	22
M3	15-23	//	276,3
M4	24-33	//	96,2
M5	34-59	//	77,9
M6	60-78	$CHCl_3$/MeOH – 95/5	5,9
M7	79-80	//	6,5
M8	81-105	//	197,1
M9	106-129	//	151
M10	130-165	//	134,6
M11	166-177	//	39,5
M12	178-189	//	50,8
M13	190-201	$CHCl_3$/MeOH – 90/10	652
M14	202-216	//	33
M15	217-225	//	157,6
M16	226-242	//	227,2
M17	243-261	//	179,5
M18	262-285	//	214
M19	286-321	//	380,4
M20	322-331	//	230
M21	332-340	$CHCl_3$/MeOH – 80/20	232,7
M22	341-356	//	750
M23	357-378	//	604,3
M24	379-396	//	778,2
M25	397-412	$CHCl_3$/MeOH – 70/30	512,1
M26	413-432	//	234,5
M27	433-470	//	798,6
M28	471-489	$CHCl_3$/MeOH – 50/50	430
M29	490-501	//	301,2

M30	502-515	//	230,7
M31	516-530	$CHCl_3$/MeOH – 30/70	560,4
M32	531-540	//	160
M33	541-551		210
M34	552-559	$CHCl_3$/MeOH – 20/80	600,7
M35	560-570		321,9
M36	571-582		345,1
M37	583-590		198,2
M38	591-604	$CHCl_3$/MeOH – 10/90	702
M39	605-612		423,1
M40	613-624	MeOH pur	822,4
M41	625-630		538,6
M42	631-635		576,1
M43	636-642		850,5
M44	643-655		215,6
M45	656-660	H_2O	726,2

Tableau 4.5: Fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes

Etude des lots M17, M18 et M19

Les fractions 243-321 constituant ces 3 lots (Tableau 4.5) d'une masse de 604 mg, ont été soumises à une nouvelle chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée avec un mélange chloroforme-méthanol à gradients différents. Le fractionnement de ce lot a été réalisé comme suit (tableau 4.4.6) :

Lots	Fractions	Eluant	Poid (mg)
O1	1-3	$CHCl_3$ %	-
O2	4-5	$CHCl_3$/MeOH – 98/2	0,5
O3	6-9	//	2,1
O4	10-16	//	2,3
O5	17-20	$CHCl_3$/MeOH – 96/4	4,6
O6	21-35	//	10,5
O7	36-47	//	69,2
O8	48-56	//	68,5
O9	57-58	$CHCl_3$/MeOH – 92/8	17,7
O10	59-77	//	68,8
O11	78-91	$CHCl_3$/MeOH – 88/12	83,5
O12	92-96	$CHCl_3$/MeOH – 80/20	5,9
O13	97-102	//	24,2
O14	103-104	$CHCl_3$/MeOH – 50/50	23,7
O15	105-106	//	5,2
O16	107	//	21,5

Tableau 4.5 : Fractionnement des lots M17, M18 et M19 de l'extrait méthanolique

Le traitement de la fraction O10 d'une masse égale à 68,8 mg, par des chromatographies préparatives CCE en phase inverse RP- 18 (éluant: MeOH/H_2O 60/40), suivi d'une filtration sur colonne de Sephadex dans le chloroforme, a permis d'isoler à l'état pur le composé **D** (17 mg).

4.5 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

4.5.1 Composé A

Stigmast -4-en-3-one

Formule brute : $C_{29}H_{48}O$

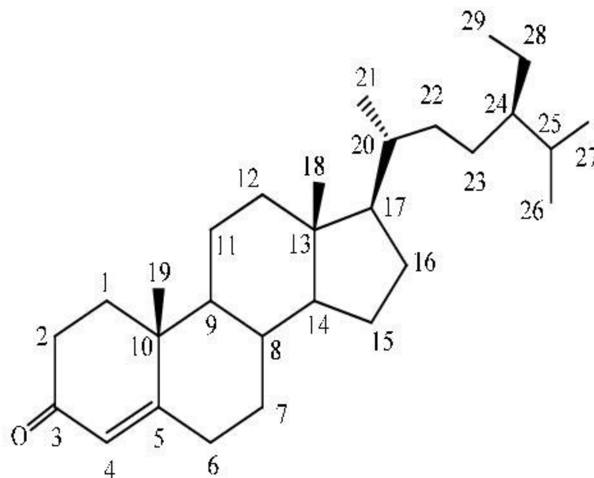
Poids moléculaire : 412 g.mol^{-1}

Quantité de produit : 2,2 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre de masse (*m/z*) : 412 [M]$^{+\cdot}$

RMN ^{1}H (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans $CDCl_3$ (Tableau 3.1, pages 52-53).



4.5.2 Composé B 24-méthylènecycloartan-3β-ol

Formule brute : $C_{31}H_{52}O$

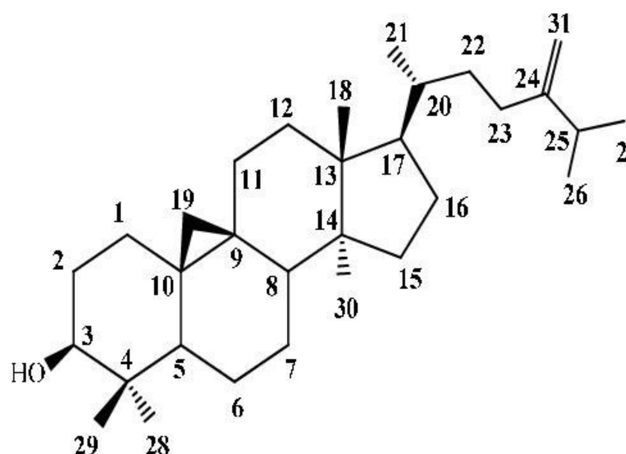
Poids moléculaire : 440 g.mol^{-1}

Quantité de produit : 5,5 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre de masse (*m/z*) : 440 [M]$^{+\cdot}$

RMN ^{1}H (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans $CDCl_3$ (Tableau 3.2, pages 66-67).



4.5.3 Composé C

Stigmast-5-èn-3 β-ol (β-sitostérol)

Formule brute : $C_{29}H_{50}O$

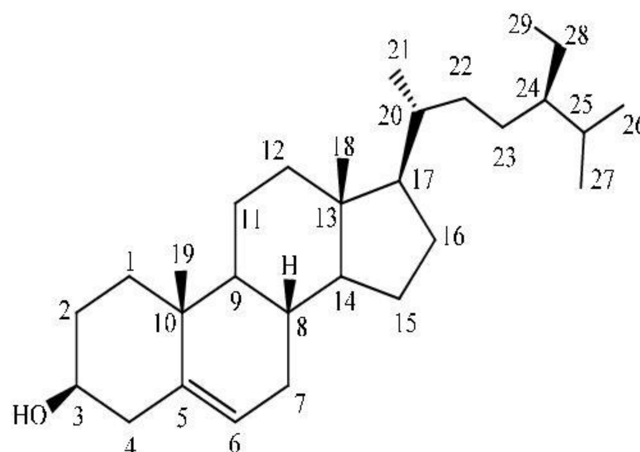
Poids moléculaire : 414 g.mol^{-1}

Quantité de produit : 2,2 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre de masse (*m/z*) : 414 $[M]^{+\cdot}$, 396 $[M-H_2O]^+$, 381 $[M-CH_3]^+$

RMN ^{1}H (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans $CDCl_3$ (Tableau 3.3, page 70).



4.5.4 Composé D

Kaempférol-3-*O*-α-rhamnosyl-7-*O*-α-rhamnoside

Formule brute : $C_{27}O_{14}H_{30}$

Poids moléculaire : 578 g.mol^{-1}

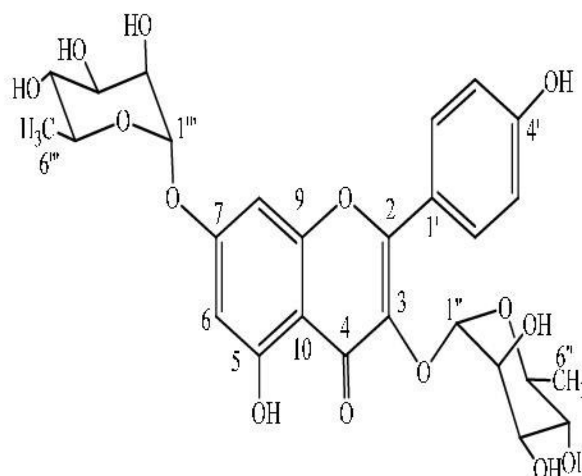
Quantité de produit : 17 mg

Etat physique : Poudre blanche

Spectre UV (nm) : 263 (bande II), 340 (bande I)

Spectre de masse (*m/z*) : 578$[M]^{+\cdot}$, 432 $[M-rhamnose]^+$, 286 $[M- rhamnose - rhamnose]^+$

RMN ^{1}H (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans $CDCl_3$ (Tableau 3.4, page 80).



Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

[1] J. B. Harborne et C. A. Williams, 2000. Advances in flavonoid research since1992. Phytochemistry 55, 481-504.

[2] E. N. Kozloff, 2005. Plants of western Oregon. Washington & British Columbia.

[3] S. Martin- Bravo, H.Meimberg , M. Luceño, W. Märkl., V. Valcárcel, C. Bräuchler, P. Vargas et G. Heubl, 2007. Molecular systematics and biogeography of Resedaceae based on ITS and *trnL-F* sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 44, 1105-1120.

[4] P. Ozenda, 1991. Flore et végétation du Sahara, 273-276.

[5] F. Quezel et S. Santa, 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales 1-2, 438-440.

[6] D. Berrahal, A. Kabouche, Z. Kabouche et C. Bruneau, 2006. Flavonoid glycosides from *Randonia africana* Coss. (Resedaceae).Biochemical Systematics and Ecology 34, 777-779.

[7] G. M. Konig, 1992. Meeresorganismen als Quelle pharmazeutisch bedeutsamer Naturstoffe (Organismes marins en tant que source de produits naturels importants sur le plan pharmaceutique). Deutsche Apotheker Zeitung 132 (14), 673-683.

[8] N. H. El-Sayed, N. M. Omara, A. K. Yousef, A. M. Farag et T. J. Mabry, 2001. Kaempferol triosides from *Reseda muricata*. Phytochemistry, 57, 575-578.

[9] A. M. Todd, 1888. The treatment and distillation of peppermint plants. American journal of pharmacy 60.

[10] M. J. Saint-Hilaire, 1809. Plante de la France Tome 4.

[11] Collectif, 2016. Dictionnaire français Larousse en ligne.

[12] C. P. Khare, 2007. Indian Medicinal Plants. Springer, 541.

[13] J. Bellakhdar, 1997. Médcine arabe ancienne et savoirs populaire.La Pharmacopée marocaine traditionnelle, 460-461.

[14] M. K. Boukef, 1986. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne.Médecine traditionnelle et pharmacopée, 253.

[15] G. Bonnier, 1934. Flore Complete Illustrée en Couleurs de France, Suisse et Belgique, Tome III.

[16] M. McIntryre, M. Pollen et J. Stevens, 1988. New Herbal. Penguin Books.

[17] Y. Doğan, 2001. A study on Reseda lutea L. distributed naturally in West Anatolia in Turkey. Turk J. Bot. 25, 137-148.

[18] Y. Dogan, H. Mert et K. Akcan, 2008. Anatomical studies of *Reseda lutea* (Resedaceae). Phytologia balcania, Sofia, 14, 91-95.

[19] M. Al-Oudat, A. Khatib Salkini et J.Tiedeman, 2005. Major native plants spieces in Khanasser area, Syria, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).

[20] K. Kubitzki et C. Bayer, 2003. The families and genra of vascular plants. Flowering plants dicotyledons, Springer Paris 5,337.

[21] Shalabia Shahat Emam, 2010. Comparative Study of the Alkaloidal and Tanni Contents of Some Reseda species. Journal of Applied Sciences Research 6(7), 888-896.

[22] F. Casetti , W. Jung, U. Wölfle, J. Reuter, K. Neumann, B. Gilb, A. Wähling, S. Wagner, I. Merfort et C.M. Schempp, 2009. Topical application of solubilized *Reseda luteola* extract reduces ultraviolet B-induced inflammation in *vivo*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 96, 260–265.

[23] N. S. Radulovic , D. B. Zlatkovic, T. I. Tomic, L. Senerovic, J. Nikodinovic-Runic, 2014. Cytotoxic effect of Bulletin of the Faculty of Science 18, 1.

[25] E. K. Batirov, M. M. Tadzhibaev et V. M. Malikov, 1979. Khim. Prir. Soedin 5, 728.

[26] E. Geiger et B. Krumbein, 1973. Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences 28, 773.

[27] D. Cristea , I. Bareau et G.Vilarem, 2003. Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola L.*). Dyes and Pigments 57, 267-272.

[28] P. E. Granda et M. Gomez-Serranillos,1970. Galen. Acta. 23, 205.

[29] C. Guyonnet, , 1973.Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Serie 277, 1993.

[30] C. Susplugas et P. Susplugas, J. P. Masse et C. Bertez, 1984. The chemical composition of Reseda phyteuma L. Plants Medicinal Phytotherapy 18, 62**.**

[31] V. Plouvier, 1966. Comptes Rendus Serie 262, 1368.

[32] M. P. Yuldashev, E. Kh. Batirov, V. M. Malikov et N. P. Yuldasheva, 1996. Khimiya Prirodnykh Soedinenii 6, 949.

[33] H. Rzadkowska-Bodalska,1969. Flavonoids in flowers of weld (Reseda lutea) Dissertationes Pharmceuticae et Pharmacologicae 21, 169-172.

[34] V. Plouvier, 1970. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie 262, 1368.

[35] O. Olsen et H. Sorensen, 1980. Glucosinolates and amines in *Reseda media*. Phytochemistry 19, 1783-1787.

[36] E. W. Underhill et D. F. Kirkland, 1972. L-2-Amino-4-phenylbutyric acid and 2-phenylethylglucosinolate, precursors of 2-hydroxy-2-phenylethylglucosinolate Phytochemistry, 11, 1973-1979.

[37] O. Olsen et H. Sorensen, 1979. Isolation of glucosinolates and the identification *O*-(α-L-rhamnopyranosyloxy) benzylglucosinolate from *Reseda odorata.* Phytochemistry 18, 1547-1552.

[38] R. Gmelin et A. Kjaer, 1970. 2-hydroxy-2-methylpropyl glucosinolate in *Reseda alba* Phytochemistry, 9, 599-600.

[39] P. L. Olsen, H. Sorensen, D. W. Cochran, E. W. Hagaman et E. Wenkert, 1973. 2(S), 4(R)-4-(β-D-galactopyranosyloxy)-4-isobutyl-glutamic acid: A new amino acid in *Reseda odorata.* Phytochemistry 12, 1713-1719.

[40] H. Sorensen**,** 1976. Saccharopine and 2-aminoadipic in *Reseda odorata.*Phytochemistry 15, 1527-1529.

[41] K. M. Lene, O. Olsen and H. Sorensen**,** 1979. Acidic Amino Acids in *Reseda lutea.* Phyrochemistry, 18, 1505-1509,

[42] K.L. Lutfullin, M.M. Tadzhibaev, U. A. Abdullaev, V.M. Malikov et S. Yu. Yunusov, 1976 . Alkaloids of *Reseda luteola*. Institute of the chemistry of plant substances. Academy of Sciences of the Uzbek SSR 5, 625-630,

[43] M. M. Tadzhibaev, K. L. Lutfullin, V. M. Malikov et S. Yu. Yunusov, 1976. An investigation of the alkaloids of *Reseda luteola.* Khimiya Prirodnykh Soedinenii 2, 270-271.

[44] I. K. Nakhatov, M. M. Tadzhibaev, V. M. Malikov et S. Yu. Yunusov, 1977. Alkaloids of *Reseda lutea*. Chemistry of natural compounds, Springer New York 13, 362- 363.

[45] H. Sorensen,1970. *O*-(α-L-rhamnopyranosyloxy) benzyamine and *O*-hydroxy benzylamine in *Reseda odorata.* Phyrochemisrry 9, 865-870.

[46] J. G. Urones, J. D. Teresa, I. S. Marcos et D. D. Martin, 1987. *Ent*-isolariciresinol in *Reseda suffruticosa.* Phyrochemisrry 26, 1540-1541.

[47] Charles S. Sell, 2003. A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry, Royal Society of Chemistry.

[48] J. McMurry et T. Begley, 2006. Chimie organique des processus biologiques, Deboeck.

[49] James R. Hanson, 2003. Natural Products: The Secondary Metabolites, Royal Society of Chemistry.

[50] T. K. Scott et A. I. Devon, 1972. Handbook of Naturally Occuring Compound.

Volume II, Terpenes Hardcover.

[51] P. M. Dewick, 2002.The Biosynthisis of C5-C25 Terpenoid Compounds. Natural Product Reports 19, 181-222.

[52] D. M. Bochar, J. A. Freisen, C. V Stauffacher et V. W. Rodwell, 1999. Biosynthesis of Mevalonic Acid from Acetyl CoA. Comprehensive Natural Products Chemistry. Elsevier Science, Oxford, UK, Vol. 2, 15-44.

[53] W. Eisenreich, M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M. H. Zenk et A. Bacher, 1998.The Desoxuxylulose phosphate Pathway of terpenoid biosynthesis in Plants and Microorganisms, Chemistry & Biology 5, 221-233.

[54] M. Rohmer, 1999. A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate.Natural Products Chemistry. Elsevier Science, Oxford, UK, Vol. 2, 45-68.

[55] S. Herz, J. Wungsintaweekul, C. A. Schuhr, S. Hecht, H. Luttgen, S. Sagner, M. Fellermeier, W. Eisenreich, M. H. Zenk, A. Bacher et F. Rohdich, 2000. Biosynthesis of terpenoids:ygbB Protein Converts 4-Dophosphocytidyl-2C-methyl-D- erythritol-2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate, Proc. Natl. Academy of Sciences USA 97, 2486-2490.

[56] F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupitz, T. Gâwert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher et D. Arigoni, 2003. The deoxyxylulose Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis: Studies on the Mechanisms of the Reactions Catalyzed by IspG and IspH Protein, Proc. Natl. Academy of Sciences USA 100, 1586-1591.

[57] S.A. Holstein et R.J. Hohl, 2004. Isoprenoids: Remarkable diversity of form and function. Lipids 39, 293–309.

[58] I. Abe, M. Rohmer et G.C. Prestwich, 1993. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. Chemistry Revue 93, 2189–2206.

[59] K. Haralampidis, M. Trojanowska et A. Osbourn, 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. Advanced Biochemical Engineering 75, 31–49.

[60] K.U. Wendt, 2005. Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: new pieces of the puzzle. Angew. Chem., Int. Ed. 44, 3966–3971.

[61] Eberhard Breitmaier, 2006. Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

[62] N. Backhouse, L. Rosales, C. Apablaza, L. Goïty, S. Erazo, C. Theodoluz, J. Rodríguez et C. Delporte, 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties

of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. Journal of Ethnopharmacology 116, 263-269.

[63] Q. Q. Zhao, S. F. Wang, Y. Li, Q. Y. Song et K. Gao, 2016. Terpenoids with anti-inflammatory activity from *Abies chensiensis*. Fitoterapia 111, 87–94.

[64] Z. Y. Jiang , J. Zhou, C. G. Huang, Q. F. Hu, X. Z. Huang, W. Wang et L. Z. Zhang, 2015.Two novel antiviral terpenoids from the cultured *Perovskia atriplicifolia*. Tetrahedron 71, 3844–38490.

[65] S. Wittayalai, C. Mahidol, V. Prachyawarakorn, H. Prawat et S. Ruchirawat, 2014. Terpenoids from the roots of *Drypetes hoaensis* and their cytotoxic activities. Phytochemistry 99, 121–126.

[66] M. J. Tan, J. M. Ye , N. Turner, C. H. Behrens, C. Q. Ke, C. P. Tang et T. Chen, 2008. Antidiabetic Activities of Triterpenoids Isolated from Bitter Melon Associated with Activation of the AMPK Pathway.**,** Chemistry & Biology 15, 263-273.

[67] N. Kambouche, B. Merah, A. Derdour, S. Bellahouel, C. Younos et R. Soulimani, 2011. Activité antihyperglycémiante d'un stérol β-sitoglucoside isolé de la plante *Anabasis articulata* (Forssk) Moq.Phytothérapie 9, 2–6.

[68] Latifa A. Al-Shammari, Wafaa H. B. Hassan, Hanan et M. Al-Youssef, 2015. Phytochemical and biological studies of *Carduus pycnocephalus* L. Journal of SaudiChemical Society 19, 410–416.

[69] F. Jamaluddin, S. Mohamed et Md. Nordin Lajis, 1995. Hypoglycaemic effect of Stigmast-4-en-3-one, from *Parkia speciosa* empty pods. Food chemistry 54, 9-13.

[70] M.E Halilu, N. October, M. Balogun, A. Agunu, A. Abubakar et M.S. Abubakar, 2013. Isolation and Characterization of Steroids from Petroleum Ether Extract of Stem Bark of Parinari curatellifolia Planch ex. Benth (Chrysobalanaceae). Journal of Natural Sciences Research, 3, 6.

[71] M. D. Ajitha bai, G. Jayakumar, P. S. Balakrishna et R. Salini, 2006. Change oftriterpene profile in the extracts of Dysoxylum species onprolonged preservation. Indian Journal of Chemistry 45B, 1060-1062.

[72] *H. Ramiarantsoa, P. A. Yao-Kouassi, C. Kanko, K.M. Assi, A. L. Djakoure et F. Z. Tonzibo, 2015. Chemicalconstituants of the antidiabetic plant* ravenala madagascarien-sis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research, 90, 24.*

[73] F. N. Yalçın, S. Piacente, A. Perrone, A. Capasso, H. Duman et I. Çalış, 2012. Cycloartane glycosides from *Astragalus stereocalyx Bornm.* Phytochemistry 73, 119-26.

[74] E. Bedir, I. Calis., R. Aquino , S. Piacente et C. Pizza, 1998. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus brachpterus* and *Astragalus microcephalus*. Journal of Natural Products 61(12):1469-72.

[75] C. Ji-Yong, L. Ping-Lin, T. Xu-Li , W. Shu-Jiang , J. Yong-Tao , Sh. Li, X. Ben-Ming, Sh. Yong-Liang et L. Guo-Qiang, 2014. Cycloartane Triterpenoids and Their Glycosides from the Rhizomes of *Cimicifuga fetida*. Journal of Natural Products 77, 1997–2005.

[76] D. Lavie, M. K. Jain et I. Kirson, 1966. Terpenoids V. Melianone from *melia azederach L.* Phytochemistry 7, 657-660.

[77] E. Tavčar, M. Barbič, J. Heilmann et S. Kreft, 2012. High leveis of cycloartanol derivatives from *Euphorbia acanthothamnos*. Biochemical Systematics and Ecology 44, 83–85.

[78] S. R. Hussein, A. Elkhateeb, M. M. Marzouk , L. F. Ibrahim et S. A. Kawashty, 2013. Phtochemical investigation of *Oligomeris linifolia* (Vahl) Macbr. (Resedaceae). Biochemical Systematics and Ecology 49, 73–76.

RĚSUME ***

Ce travail est consacré à l'investigation phytochimique de l'espèce *Reseda alphonsii*, plante saharienne endémique à l'Afrique du nord, appartenant à la famille Resedaceae. Famille connue pour sa richesse en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique comme les flavonoïdes.

Nos travaux d'investigation chimique portés sur les extraits acétate d'éthyle et méthanolique des parties aériennes de *R. alphonsii*, plante n'ayant fait l'objet d'aucune étude phytochimique antérieure, ont conduit à l'isolement de quatre constituants chimiques et cela par l'utilisation de diverses techniques chromatographiques (CC, CCE et CCM). Leurs structures moléculaires ont été élucidées sur la base de méthodes spectroscopiques notamment la spectrométrie de masse, la spectroscopie ultra–violette et la résonance magnétique nucléaire dans ses multiples techniques : RMN ^{1}H, RMN ^{13}C et RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY H-H et NOESY), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature.

Trois métabolites secondaires ont été isolés de l'extrait acétate d'éthyle de la plante, dont deux composés **A** et **B** décrits pour la première fois dans la famille Resedaceae. Il s'agit d'un triterpène tétracyclique à squelette cycloartane 24-méthylènecycloartanol (**B**) et d'une stérone tétracyclique nommée stigmast-4-èn-3-one (**A**). Le troisième composé est un phytostérol nommé β-sitostérol (**C**) fréquent dans le règne végétal. A partir de l'extrait méthanolique des parties aériennes, on a pu isoler un flavonoïde glycosylé kaempferol-3,7-di-*O*-α-L-rhamnopyranoside (**D**).

MOTS CLĚS***

Phytochimie, Resedaceae, *Reseda alphonsii*, triterpénoïdes, flavonoïdes, RMN 1D et 2D, spectroscopie de masse.

ملخص ***

يتمثل هذا العمل في دراسة فيتو كيميائية للنبتة *Reseda alphonsii*, نبتة صحراوية متوطنة في شمال إفريقيا، و التي تنتمي إلى عائلة Resedaceae, هذه العائلة معروفة بوفرتها بمختلف الأيض الثانوي ذات أهمية بيولوجية كبيرة مثل الفلافونويدات.

بحثنا الكيميائي يتركز على المستخلصين أسيتات الايثيل والميثانول للنبتة *R. Alphonsii* التي لم تخضع لأي دراسة كيميائية سابقة. و قد أدى هذا العمل الى عزل أربعة مركبات طبيعية و ذلك باستخدام تقنيات كروماتوغرافية مختلفة (CCM, CCE, CC). تم تحديد صيغها الكيميائية بواسطة التحاليل المطيافية المختلفة و خاصة مطيافية الكتلة Masse, مطيافية تحت الحمراء Infra-rouge, مطيافية فوق البنفسجي Ultra-vilolet ومطيافية الرنين المغناطيسي RMN بتقنياتها المتعددة: RMN^1H, $RMN^{13}C$ و RMN 2D (HSQC,HMBC, H-H COSY و NOESY) كما استعملنا المقارنة مع المعطيات المكتبية.

ثلاثة مركبات طبيعية عزلت من مستحلص أسيتات الايثيل للأجزاء الهوائية للنبتة حيث أن اثنان منها قد يستخرج للمرة الأولى سواء في النوع *Reseda* أو من العائلة" Resedaceae: تريتربان رباعي الحلقات ذو هيكل سيكلوأغتان Cycloartane , ستيغون رباعي الحلقات Stérone و ستيغول Stérol منتشر بكثرة في المملكة النباتية. انطلاقا من مستحلص الميثانول للأجزاء الهوائية استطعنا أن نستخرج فلافونويد واحد.

الكلمات المفتاحية **

فيتوكيمياء، Rsedaceae ، *Reseda alphonsii*،التريتربينويدات، الستيرويدات، الفلافونويدات، RMN 1D و 2D و مطيافية الكتلة.

Investigation des métabolites secondaires de *Reseda alphonsii*

Hakim Benhabrou "1", *Catherine Lavaud* "2", *Mohammed Benkhaled* "1"

1-Laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE), Faculté des sciences, Université El-hadj lakhdar. Batna, Algérie

2- CNRS FRE 2715 Laboratoire de Pharmacognosie, 51097Reims, France

Résumé

Trois produits ont été isolés à partir de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Reseda alphonsii* (Resedaceae). Un triterpène, le 24-méthylènecycloartan-3β-ol (**1**) et deux autres composés de nature stéroïdique à squelette stigmastane : stigmast-4-èn-3-one (**2**) et stigmast-5-èn-3β-ol (**3**). Ce dernier commun au règne végétal et particulièrement omniprésent, est cité à titre comparatif avec le composé (**2**). Leurs structures ont été établies par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY HSQC *J*-modulé, HMBC, NOESY et la spectroscopie de masse EI-MS).

Mots clés : *Reseda alphonsii*, Resedaceae, 24-méthylènecycloartan-3β-ol, stigmast-4-èn-3-one, stigmast-5-èn-3β-ol

1- Introduction

Une étude bibliographique exhaustive réalisée sur le genre *Reseda* (resedaceae) montre sa richesse en métabolites secondaires tels que les amino-acides [1], les amines, les glycosinolates [2] et les flavonoides [3],[4].

Dans le cadre de notre programme de recherche destiné à la découverte de nouvelles molécules d'origine végétale d'intérêt biologique et thérapeutique, l'étude phytochimique de l'espèce *Reseda alphonsii*, plante saharienne endémique, a été ainsi mise en oeuvre. Cette dernière réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de la plante en question, nous a permis d'isoler par les méthodes chromatographiques et de caractériser par RMN et spectrométrie de masse essentiellement, un triterpène **1** ainsi que deux composés de nature stéroïdique **2** et **3**.

1- Résultats et discussion

COMPOSE 1

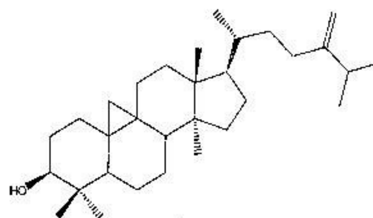


Fig. 1 : 24-méthylènecycloartan-3β-ol

Le spectre de masse (EI-MS) montre un pic de l'ion moléculaire m/z = 440 $[M]^{+\cdot}$, correspondant à une formule brute en $C_{31}H_{52}O$. Le spectre RMN^{1}H montre dans la région blindée, deux doublets à 0.38 ppm (*d*, *J*= 4.1 Hz, H-19 *exo*) et à 0.60 ppm (*d*, *J*= 4.0 Hz, H-19 *endo*) correspondant aux deux protons géminés non équivalents du noyau cyclopropane des dérivés du cycloartanol [5]. Il montre également dans la région déblindée, deux singulets larges à 4.71 ppm (*sl*, H-31b) et 4.77 ppm (*sl*, H-31a) indiquant la présence d'un groupement méthylène exocyclique lié au carbone C-24 et un doublet dédoublé à3.35 ppm ($J_{ax\text{-}ax}$ = 11.1 Hz et $J_{ax\text{-}éq}$ = 4.3 Hz) attribuable au proton H-3α. Il présente

"1" Hakim Benhabrou, adresse : Département de chimie, Faculté des sciences, Université El-hadj lakhdar, Batna, Algérie, E-mail : Hakimbenhabrou@gmail.com

Egalement 7 signaux résonant entre 0.95 et1.09 ppm correspondant aux 7 méthyles d'un triterpène tétracyclique [6]. Le spectre RMN ^{13}C montre 31 signaux correspondant à 7 groupements méthyles, 12 groupements méthylènes dont 1 éthylénique C-31 et 6 groupements méthines dont 1 oxyméthine C-3 et 6 atomes de carbone quaternaire dont 1 oléfinique C-24. Le nombre de carbone égale à 31 confirme la nature triterpénique de ce composé. L'analyse de l'expérience COSY permet d'observer les couplages attendus entre le proton H-3 et les protons H-2 repérés à 1.62-1.80 ppm sous forme de multiplets. Le proton H-25 de la chaine latérale résonant à 2.28 ppm sous forme d'un septuplet (J= 6,8 Hz) corrèle avec les protons des groupements méthyles H-26 et H-27. L'expérience de corrélations hétéronucléaires en $^{1}J_{H-C}$ ou HSQC J-modulé conduit à attribuer tous les protons de ce composé ainsi que les carbones qui les portent. A partir des protons des groupements méthyles, l'expérience HMBC permet de localiser les déplacements chimiques des carbones voisins du squelette carboné. On citera à titre d'exemple :

- ✓ les protons H-28 et H-29 présentant des corrélations avec les carbones C-3 (δ_C 78.8), C-4 (δ_C 40.5) et C-5 (δ_C 47.1).
- ✓ les protons H-21 couplant avec les carbones C-20 (δ_C 36.1), C-17 (δ_C 52.2) et C-22 (δ_C 34.9)
- ✓ les protons H-19 corrélant avec C-1 (δ_C 31.9), C-5, C-8 (δ_C 48.0), C-9 (δ_C 19.9), C-10 (δ_C 26.0) et C-11 (δ_C 26.4).

L'analyse combinée des spectres RMN ^{1}H, ^{13}C, COSY, HSQC J-modulé et HMBC permet d'attribuer sans ambiguïté les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **1**. La stéréochimie de ce composé a été établie en analysant les effets NOE observés sur le spectre NOESY. En effet, ce dernier présente des corrélations sur la face α entre les protons H-3/H-28, H-3/H-5 et H-30/H-11. Sur la face β, des effets NOE ont été observés entre H-29/H-19 *endo*, H-19 *endo*/H-19 *exo*, H-19 *endo*/H-8 et H-18/H-8.

Ces données spectroscopiques, conjuguées à celles de la littérature, permettent d'attribuer sans ambiguïté à ce composé, la structure triterpénique suivante : 24-méthylènecycloartan-3β-ol (**1**). Ce triterpène a été isolé précédemment de plantes du genre *Euphorbia* [7].

COMPOSE 2

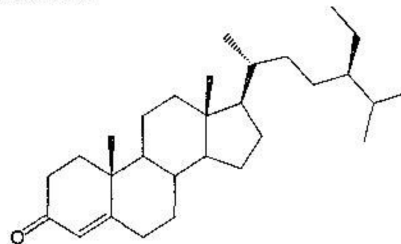


Fig. 2 : stigmast-4-en-3-one

Le spectre de masse (EI-MS) du composé **2** montre un pic d'ion moléculaire à m/z = 412 $[M]^{+\cdot}$, correspondant à une formule brute en $\mathbf{C_{29}H_{48}O}$. Le spectre RMN^{1}H présente à champ faible, un singulet à 5.77 ppm correspondant à un proton oléfinique et à champ fort, 6 signaux allant de 0.76 à 1.23 ppm attribuables à 6 groupements méthyles, se répartissant en 3 doublets, 1 triplet et 2 singulets. Le nombre réduit de méthyles comparé au composé précédent, laisse supposer qu'il s'agit d'un composé de nature stéroïdique [9, 10]. L'absence du signal du proton H-3 résonant aux alentours de 3.5 ppm implique que ce composé ne porte pas un groupement hydoxyle sur le carbone C-3. Cette supposition est confirmée par le spectre RMN ^{13}C qui ne montre pas de signal du carbone C-3 observé habituellement vers 72 ppm dans le cas des stéroles [9], révélant plutôt un signal extrêmement déblindé résonant à 199.8 ppm, attribuable en conséquence au signal du carbonyle en C-3. En plus, il permet de compter 28 signaux correspondant à 6 groupements méthyles, 11 groupements méthylènes, 8 groupements méthines dont 1 oléfinique résonant à 123.7 ppm et 3 carbones quaternaires dont 1 oléfinique (171.8 ppm). Le déblindage de ce dernier suggère la présence d'un système ènone conjugué (cétone-α,β-insaturée). Cette attribution est confirmée par l'expérience HMBC qui montre des corrélations entre les protons H-19 et le carbone éthylénique résonant à 171.8 ppm qui ne peut être donc que le carbone C-5. L'analyse de l'expérience HSQC J-modulé permet d'identifier le carbone C-4 à 123.7 ppm et le proton H-4 à 5.77 ppm. L'analyse combinée des spectres COSY, HSQC J-modulé et HMBC conduit à attribuer les déplacements chimiques des protons et des carbones de ce composé. L'ensemble des données spectroscopiques, appuyées par celles de la littérature [10, 11] permet d'identifier sans équivoque pour ce composé la structure : **stigmast-4-en-3-one**.

COMPOSE 3

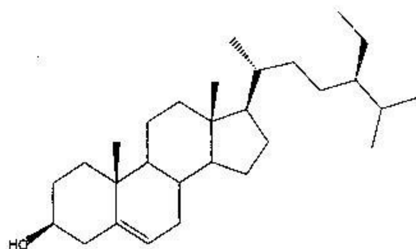


Fig. 3 : stigmast-5-èn-3β-ol

Le composé **3** commun du monde végétal, présentant un pic de l'ion moléculaire m/z = 414 $[M]^{+\cdot}$, ayant une formule brute $C_{29}H_{50}O$, correspond au **stigmast-5-èn-3β-ol**, plus communément appelé β-sitostérol. Il a été également identifié par comparaison avec un échantillon témoin et par les données de la littérature.

3- Partie expérimentale

Les parties aériennes (800 g) de *Reseda alphonsii* (resedaceae) séchées et pulvérisées, sont ensuite mises à macérer successivement dans le cyclohexane, l'acétate d'éthyle et enfin dans le méthanol. On obtient après filtration et évaporation des solvants, trois extraits: cyclohexanique, acétate d'éthyle, et méthanolique.

Une chromatographie sur colonne de gel de silice normale est effectuée sur 8.5 g d'extrait acétate d'éthyle. L'élution est réalisée par le n-hexane pur puis un gradient de n-hexane-acétate d'éthyle, ensuite par un mélange acétate d'éthyle-méthanol, et enfin par du méthanol pur. A l'issue de ce fractionnement, 62 fractions ont été obtenues (S1-S62).

Les lots S8 et S9, de masse égale à 148.3 mg, ont été chromatographiés sur une colonne de gel de silice en phase normale, préparée dans le n-hexane (éluant: n-hexane-acétate d'éthyle). Ce fractionnement nous a permis d'obtenir 23 sous-fractions (D1-D23).

Le traitement des fractions D7, D8 et D9 de masse égale à 19.6 mg, par des chromatographies préparatives CCE en phase normale (éluant: n-hexane-acétate d'éthyle: 75-25) a permis d'isoler les composés **1** et **3** à l'etat pur.

Le lot S7 de masse égale à 106 mg est soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale, préparée dans le n-hexane (éluant: n-hexane-acétate d'éthyle), nous a permis d'avoir 30 sous-fractions (B1-B30). La sous-fraction B12 (50 mg) soumise à une **CC** en phase normale (éluant: n-hexane –acétate d'éthyle), a permis d'obtenir 20 autres sous fractions (C1-C20).

La purification finale de C13 (19.4 mg) par chromatographie préparative CCE en phase normale (éluant: n-hexane - acétate d'éthyle: 85-15) a permis d'obtenir le composé **2** pur.

Les structures des composés purifiés sont déterminées par les méthodes spectroscopiques citées précédemment (spectroscopie de masse EI, RMN ^{13}C, RMN ^{1}H, COSY H-H, HMBC, HSQC *J*-modulé, NOESY).

24-méthylènecycloartan-3β-ol (1)

Poudre blanche, $C_{31}H_{52}O$, IR ν_{max} cm^{-1} 3434, 1620. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) : δ_H 3,35 (1H, *dd*, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.1 Hz et $J_{ax\text{-}éq}$ = 4.3 Hz, H-3), 1.35 (1H, *m*, H-5), 1.55 (1H, *dd*, *J*= 12.3, *J*= 4.7 Hz, H-8), 1.63 (1H, *m*, H-17), 0.38 (*d*, *J*= 4.1 Hz, H-19 *exo*), 0.60 (*d*, *J*= 4.0 Hz, H-19 *endo*), 1.02 (6H, *sl*, H-18, H-28), 0.95 (6H, *sl*, H-21, H-30), 0.86 (3H, *sl*, H-29), 1.07 (3H, *d*, *J*= 2.9 Hz, H-26), 109 (3H, *d*, *J*= 2.9Hz, H-27), 1.45(1H, *m*, H-20), 2.28 (1H, *sept*, *J*= 6.8 Hz, H-25), 4.71 (1H, *sl*, H-31b) et 4.77 (1H, *sl*, H-31a). RMN ^{13}C (125 Hz, $CDCl_3$) : δ_C 78.8 (C-3), 40.5 (C-4), 47.1 (C-5), 48.0 (C-8), 19.9 (C-9), 26.0 (C-10), 45.3 (C-13),48.8 (C-14), 52.2 (C-17), 18.0 (C-18), 18.3 (C-21), 21.9 (C-26), 22.0 (C-27), 25.4 (C-28), 14.0 (C-29), 19.3 (C-30), 33.8 (C-25), 156.9 (C-24), 105.9 (C-31). EI-MS, m/z 440 $[M]^{+\cdot}$, 426 $[M - CH_2]^+$, 425 $[M - CH_3]^+$, 422 $[M - H_2O]^+$, 410 $[M - 2xCH_3]^+$, 408 $[M - OH - CH_3]^+$.

Stigmast-4-èn-3-one (2)

Poudre blanche, $C_{29}H_{48}O$, RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) : δ_H 2.41-2.49 (2H, *m*, H-2), 5.77 (1H, s, H-4), 2.33-2.43 (2H, *m*, H-6), 1.57 (1H, *m*, H-8), 0.96 (1H, *m*, H-9), 1.08 (1H, *m*, H-14), 1.16 (1H, *m*, H-17), 1.42 (1H, *m*, H-20), 0.98 (1H, *m*, H-24), 1.72 (1H, *m*, H-25), 076 (3H,*s*, H-18), 1.23 (3H, *s*, H-19), 097 (3H, *d*, *J*= 6.6 Hz, H-21), 0.86 (3H, *d*, *J*= 6.8 Hz, H-26), 0.89 (3H, *d*, *J*= 6.8 Hz, H-27), 0.90 (3H, *m*, H-29). RMN ^{13}C (125 Hz, $CDCl_3$) : δ_C 199.8 (C-3), 123.7 (C-4), 171.8 (C-5), 35.6 (C-8), 53.8 (C-9), 38.6 (C-10), 42.4 (C-13), 55.8 (C-14), 55.9 (C-17), 11.9 (C-18), 17.4 (C-19), 18.7 (C-21), 19.0(C-26), 19.8(C-27), 12.0 (C-29), 29.1 (C-25). EI-MS, m/z 412 $[M]^{+\cdot}$, 397 $[M- CH_3]^+$, 370 $[M - CH(CH_3)_2]^+$, 340 $[M-CH(CH(CH_3)_2CH_2CH_3]^+$, 327 $[M - CH_2CH(CH(CH_3)_2CH_2CH_3]^+$.

Stigmast-5-èn-3-one (**3**)

Poudre blanche, $C_{29}H_{48}O$, RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) : δ_H 3.45 (1H, *m*, H-3), 5.26 (1H, *m*, H-6), 1.47 (1H, *m*, H-8), 1.05 (1H, *m*, H-17), 067 (3H, *s*, H-18), 1.00 (3H, *s*, H-19), 0.92 (3H, *d*, *J*= 6.3 Hz, H-21), 0.84 (3H, *m*, H-26), 0.86 (3H, *m*, H-27), 0.87

(3H, *m*, H-29). RMN ^{13}C (125 Hz, $CDCl_3$) : δ_C 36.5 (C-1), 29.7 (C-2), 71.8 (C-3), 37.0 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6),31.7 (C-7), 31.9 (C-8), 50.2 (C-9), 34.0 (C-10), 21.2 (C-11), 39.8 (C-12), 42.3 (C-13), 56.5 (C-14), 24.3 (C-15), 28.3 (C-16), 54.4 (C-17), 11.9 (C-18), 19.4 (C-19), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21), 34.0 (C-22), 26.1 (C-23), 44.9 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.1 (C-28), 12.0 (C-29). EI-MS, m/z 414 $[M]^{+\cdot}$,396 $[M-H_2O]^+$, 381 $[M-H_2O-CH_3]^+$, 273 $[M-C_{10}H_{21}]^+$.

4- Conclusion

Ce travail nous a permis d'isoler et d'identifier trois composés **1**, **2** et **3**. Si ce dernier est un métabolite secondaire commun pratiquement à toutes les plantes, il n'en est pas de même pour les deux autres **1** et **2**. Ces deux composés n'ont été identifié que dans un nombre très limité de plantes : (*Pinus taeda* [8], *Quassia amara* [9] pour **2**, et *Euphorbia aleppica* [5],*Larix kaempferi* [6] pour **1** .

5- Références

[1] Lene Kaa M.,Ole O., and Hilmer S.,1980, Acidic amino acids in *Reseda luteola*, *Phytochemistry*, **19**, 1783-1787.

[2] Ole O., and Hilmer S., 1980, Glucosinolates and amines in *Reseda media*, *Phytochemistry*, **19**, 1783-1787.

[3] Nabil H. E., Nehad M. O., 2001, Kaempferol triosides from *Reseda muricata*, *Phytochemistry*, **57**, 575-578.

[4] Berrahal D., Kabouche A., 2006, Flavonoid glycosides from *Reseda villosa* (Resedaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 777-779.

[5] Herz W., Watanabe K., 1985, Cycloartanes, from Lindheimera texana, *Phytochemistry*, **24** 2645-2654.

[6] Sigrid M. S., 1996, two pentacyclic triterpenes from Phytolacca dodecandra roots, *Phytochem -istry*, **43**, 179-182.

[7] Sevil O., Faliha G., and Long Z.L., 1996, Aleppicatines A and B from *Euphorbia aleppica*, *Phytochemistry*, **42**, 473-478.

[8] Hironori O., Reiko T., and T.M., 1998, Tetracyclic triterpenes and other constituents from the leaves and bark of *Larix kaempferi* *Phytochemistry*, **49**, 1761-1768.

[9] Popov S.S., Marekov N.L., and K.M. I., 1985, Sterols from some black sea ulvaceae, *Phytochmistry*, **24**, 1987-1990.

[10] Gasper E.M.M., and Das Neves H.J.C., 1993, Steroidal constituents frommature wheat straw, *Phytochemistry*, **34**, 523-527.

[11] Migliulo A., Piccialli V., 1990, Steroidal ketones from the sponge *Geodia cydonium*, *Natural products*,**53**,262-1266.